

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

***CAMPUS MACAÉ***

**CURSO DE NUTRIÇÃO**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO MEL PROVENIENTE DA AGRICULTURA  
FAMILIAR DO DISTRITO DE CANTAGALO-RIO DAS OSTRAS-RJ E ADJACÊNCIAS**

**Macaé/RJ**

**2021**

LARISSA AGUIAR DE MORAES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO MEL PROVENIENTE DA AGRICULTURA  
FAMILIAR DO DISTRITO DE CANTAGALO-RIO DAS OSTRAS-RJ E ADJACÊNCIAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Nutrição, da Universidade Federal do  
Rio de Janeiro *Campus* – Macaé como requisito  
parcial à obtenção do título de Nutricionista.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ingrid Annes Pereira

**Macaé/RJ**

**2021**

## CIP - Catalogação na Publicação

Aq Aguiar de Moraes, Larissa  
Qualidade Microbiológica do mel proveniente da agricultura familiar do distrito de canta gal- rio das ostras e adjacencias / Larissa Aguiar de Moraes. -- Rio de Janeiro, 2021.  
58 f.

Orientador: Ingrid Annes Pereira.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloisio Teixeira, Bacharel em Nutrição, 2021.

1. Análise microbiológica do mel . 2. Análise físico- química do mel . I. Annes Pereira, Ingrid , orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por tudo que me concedeu, pela saúde, força, coragem e sabedoria para superar os obstáculos e realizar esta conquista. Por sua companhia constante, todas as bênçãos alcançadas e por ter colocado tantas pessoas tão boas em meu caminho e por tornar tudo possível.

Aos meus pais, familiares, professores, em especial a orientadora, Prof<sup>a</sup> Ingrid Annes Pereira, a Prof<sup>a</sup> Flávia Beatriz Custódio, e Dra: Regina Maria Finger, pela orientação durante a execução deste trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio da Bolsa de Iniciação Científica.

## RESUMO

O mel é um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do organismo, como compostos fenólicos, aminoácidos, vitaminas, sais minerais, ácidos orgânicos e enzimas, que atribuem efeitos terapêuticos ao produto. O mel, juntamente com os demais produtos das abelhas, está associado a uma imagem de produto natural, saudável e seguro. Porém, durante o manuseio, acondicionamento e armazenamento pode ocorrer contaminações microbiológicas. O aumento considerável da produção brasileira de mel nos últimos anos tem despertado interesse científico em atestar sua qualidade sanitária, devido seu potencial para comercialização e alternativa sustentável para desenvolvimento da agricultura familiar. Nesse cenário, o presente trabalho teve como objetivo realizar o diagnóstico microbiológico dos principais agentes associados ao perfil higienicossanitário físico-químico de amostras de mel produzido em unidades familiares localizadas no distrito de Cantagalo, Rio das Ostras-RJ e municípios adjacentes. As análises microbiológicas realizadas foram, Contagem de Coliformes totais e Termotolerantes, fungos e leveduras, *Staphylococcus* coagulase-positivos, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. e detecção de *Salmonella* spp.. As análises físico-químicas realizadas foram, umidade, acidez e sólidos solúveis totais. Foram analisadas seis amostras de dois lotes de mel distintos, e para todas estas houve ausência de *Salmonella*, de *Clostridium* sulfito redutores e coliformes totais e termotolerantes. Nas análises de mesófilas, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* e fungos e leveduras, foram obtidos resultados de isolamento positivos, porém as contagens foram inferiores ao critério de confiança de contagem, que estabelece um número mínimo de 25 UFC/mL. Em relação às análises físico-químicas, houve alteração de acidez em 50% das amostras, os outros parâmetros físico-químicos estão de acordo com a legislação. A maioria das amostras de mel avaliada apresentou-se de acordo com os padrões estabelecidos pelas legislações vigentes, respeitando os parâmetros de qualidade sanitária e segurança alimentar.

**Palavras-chave:** Mel; qualidade, marcadores higienicossanitários e produção familiar.

## ABSTRACT

Honey is a high quality food, rich in energy and countless other substances beneficial to the balance of the body's biological processes, such as phenolic compounds, amino acids, vitamins, minerals, organic acids and enzymes, which attribute therapeutic effects to the product. Honey, along with other bee products, is associated with an image of a natural, healthy and safe product. However, microbiological contamination may occur during handling, conditioning and storage. The considerable increase in Brazilian honey production in recent years has aroused scientific interest in attesting to its health quality, due to its potential for commercialization and a sustainable alternative for the development of family agriculture. In this scenario, the present study aimed to carry out the microbiological diagnosis of the main agents associated with the physical-chemical hygienic-sanitary profile of honey samples produced in family units located in the district of Cantagalo, Rio das Ostras-RJ and adjacent municipalities. The microbiological analyzes carried out were, Count of total and thermotolerant coliforms, fungi and yeasts, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Clostridium* spp. and *Bacillus* spp. and detection of *Salmonella* spp .. The physical-chemical analyzes carried out were moisture, acidity and total soluble solids. Six samples from two different honey batches were analyzed, and for all of them there was an absence of *Salmonella*, *Clostridium* sulfite reducers and total and thermotolerant coliforms. In the analysis of mesophiles, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* and fungi and yeasts, positive isolation results were obtained, however the counts were lower than the counting confidence criterion, which establishes a minimum number of 25 CFU / mL. Regarding the physical-chemical analyzes, there was a change in acidity in 50% of the samples, the other physical-chemical parameters are in accordance with the legislation. Most of the samples of honey evaluated were presented according to the standards established by current legislation, respecting the parameters of health quality and food safety.

**Keywords:** Honey; quality, hygienic-sanitary markers and family production.

## LISTA TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Composição físico-química do mel, segundo a Taco.....	14
<b>Tabela 02:</b> Análises microbiológicas para avaliação do perfil higienicossanitário das seis amostras de mel provenientes da agricultura familiar de Cantagalo-Rio das Ostras e adjacências.....	29
<b>Tabela 03:</b> Análises físico-químicas das seis amostras de mel provenientes da agricultura familiar de Cantagalo-Rio das Ostras e adjacências.....	34

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Amostras analisadas.....	22
Figura 2: Contagem de <i>Bacillus</i> spp. e Bactérias Mesófilas.....	29



## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.

**%:** Por Cento

**≤:** Menor ou Igual

**≥:** Maior ou Igual

**APA:** Água peptonada alcalina

**APGF:** Água Pepto Glico Fosfatada

**BHI:** *Brain Heart Infusion Broth* (Caldo Cérebro Coração)

**CBT:** Contagem Bacteriana Total

**C°:** Grau *Celsius*

**DTA:** Doença Transmitida por Alimentos

**EDTA:** Etileno-diamina-tetra-acetato

**EMB:** Eosina Azul de Metileno

**g:** Grama

**H:** Hora

**IN:** Instrução Normativa

**Kg:** Kilograma

**KOH:** Hidróxido de Potássio

**L:** Litro

**LST:** Lauril Sulfato Triptose

**MAPA:** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**mL:** Mililitro

**mm:** Milímetro

**N°:** Número

**NaCl:** Cloreto de Sódio

**NMP:** Número Mais Provável

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PCA:** *Plate Count Agar* (Agar padrão para contagem)

**pH:** Potencial Hidrogeniônico

**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada

**SS:** *Shigella-Salmonella*

**UFC:** Unidade Formadora de Colônia

**UFRJ:** Universidade Federal do Rio de Janeiro

**UHT:** *Ultra High Temperature* (Ultra Alta Temperatura)

**VBBL:** Lactose Verde Brilhante Bile

**VRBA:** *Violet Red Bile Agar*

**XLD:** Desoxicolato-lisina-xilose

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1 OBJETIVOS GERAIS .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. JUSTIFICATIVA.....	11
4. REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
4.1 CENÁRIOS DA APICULTURA NO BRASIL .....	12
4.2 AGRICULTURA FAMILIAR E SUA EXPRESSÃO NA PRODUÇÃO DO MEL.....	12
4.3 ASPECTOS NUTRICIONAIS E FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL.....	14
4.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO MEL .....	16
5. METODOLOGIA.....	21
5.1 AMOSTRAGEM.....	21
5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE MARCADORES HIGIÊNICOS SANITÁRIOS DO MEL.....	22
5.2.1 CONTAGEM PADRÃO DE BACTÉRIAS MESÓFILAS HETEROTRÓFICAS E ANAERÓBIAS ESTRITAS E FACULTATIVAS.....	23
5.2.2 CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES .....	23
5.2.3 CONTAGEM DE BACTÉRIAS E BOLORES E LEVEDURAS.....	23
5.2.4 CONTAGEM DE STAPHYLOCOCCUS SPP .....	24
5.2.4.1 PROVA DA COAGULASE .....	24
5.2.4.2 PROVAS DE <i>Voges-Proskauer</i> , FERMENTAÇÃO DA MALTOSE E DO MANITOL E REDUÇÃO DE NITRATOS.....	24
5.2.4.3 PRODUÇÃO DE UREASE.....	25
5.2.4.4 DETECÇÃO DA ENZIMA DNASE.....	25
5.2.5 CONTAGEM DE <i>Bacillus cereus</i> .....	25
5.2.6 CONTAGEM DE <i>Clostridium</i> spp.....	25
5.2.7 DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> .....	26
5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	27
5.3.1 UMIDADE .....	27
5.3.2 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS .....	27
5.3.3 ACIDEZ.....	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 CONTAGEM DE BACTÉRIAS MESÓFILAS.....	29
6.1.1 CONTAGEM DE <i>Bacillus cereus</i> .....	29
6.1.2 CONTAGEM E DETECÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	30
6.1.3 CONTAGEM DE <i>Clostridium</i> spp.....	31
6.1.4 CONTAGEM DE FUNGOS FILAMENTOSOS E LEVEDURAS.....	31
6.1.5 PESQUISA DE <i>Salmonella</i> .....	32
6.1.6 CONTAGEM DE COLIFORMES.....	32
6.2 UMIDADE .....	34
6.2.1 ACIDEZ.....	34
6.2.2 SÓLIDOS SOLÚVEIS TOTAIS .....	35
7. CONCLUSÃO.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

A apicultura é uma das atividades que mais tem crescido nos últimos anos no Brasil principalmente no nordeste brasileiro, constituindo-se em uma alternativa capaz de poder elevar seu nível socioeconômico aproveitando o potencial de diversas áreas onde é possível a exploração apícola. A criação racional de abelhas constitui-se de uma atividade em que se consegue obter bons resultados econômicos, ecológicos e sociais. Essa atividade, desenvolvida ao longo do tempo por pequenos, médios, grandes produtores, vem despertando o interesse de muitos criadores e instituições do Brasil (RODRIGUES, 2004). Adicionalmente, houve também aumento na procura dos méis dos meliponíneos (abelhas sem ferrão) com fins alimentares e medicinais e a popularização da criação destas abelhas, recentemente regulamentada pelo CONAMA por meio da resolução nº 496, de 19 de agosto de 2020.

O mel produzido pela abelha *Apis mellifera L.* é resultado da desidratação e transformação do néctar. A quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar (CRANE, 1990). O mel resultante terá características diferentes, principalmente quanto à cor, sabor e perfume. Por isso, a caracterização regional e o estabelecimento de padrões são de grande importância, considerando a diversidade botânica e a variação climática de cada região (ALVES, 2008; PEREIRA et al., 2003).

O mel é composto principalmente de glicose (80%) e água (17%), além de outras substâncias (3%). Portanto, é um alimento complexo do ponto de vista biológico e também analítico, pois sua composição varia muito em função de sua origem floral, geográfica e de safra para safra, envolvendo condições climáticas (BASTOS, 1995).

É de fundamental importância a caracterização dos méis visando à criação de padrões, segundo os fatores ambientais como o ar, clima, relevo, umidade, o tipo de solo, o vento, composição atmosférica e precipitação pluvial e florísticos das regiões, estabelecendo critérios comparativos nas análises e respeitando as características peculiares de cada mel (CRANE, 1990).

Os trabalhos de análises físico-químicas e microbiológicas de méis visam a comparar os resultados obtidos com padrões ditados por órgãos oficiais internacionais, ou com os

estabelecidos pelo próprio país, deixando claro não só uma preocupação com a qualidade do mel produzido internamente, como também torna possível a fiscalização de méis importados com relação à sua alteração (MARCHINI, 2001). A qualidade microbiológica também varia, já que os produtos apícolas apresentam uma microbiota própria que pode ser introduzida pelas próprias abelhas, e microrganismos considerados acidentais, que são introduzidos de forma indesejada devido a falta de higiene na manipulação e beneficiamento incorretos (SCHLABITZ et al., 2010), além de más condições de armazenamento e acondicionamento. Por ser um produto muito apreciado e de fácil adulteração, torna-se alvo de ações que depreciam a sua qualidade. Embora o mel seja um produto que por suas características físicas e químicas não apresente alta susceptibilidade à proliferação de microrganismos, a ação de fatores externos (ambientais, condições de manipulação e estocagem) representa um potencial para sua contaminação. Devido a estes fatores é de extrema importância para comercialização deste produto, a realização de análises laboratoriais para a determinação da sua qualidade e segurança alimentar.

Concernente a este cenário, o presente trabalho de pesquisa visou realizar o diagnóstico microbiológico dos principais agentes associados ao perfil higienicossanitário e daqueles associados a doenças de transmissão alimentar (DTAs), a saber: coliformes totais e termotolerantes, fungos e leveduras, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase-positivos, *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp..

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem como objetivo proceder às análises físico-químicas, o isolamento e a identificação das espécies bacterianas que representam os marcadores da qualidade higienicossanitária de amostras de mel produzido em propriedades familiares situadas no Distrito de Cantagalo em Rio das Ostras (Rio de Janeiro) e municípios adjacentes. Dessa forma, o projeto visa adotar uma metodologia pré-estabelecida pelos padrões regulamentares vigentes no nosso país.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realização da contagem bacteriana total (CBT) e da contagem de Bolores e leveduras proveniente das amostras de mel obtidas de produtores familiares de Cantagalo (Rio das Ostras) dentre outras localidades;
- Detecção e contagem de microrganismos indicadores da contaminação fecal em amostras de mel obtidas de produtores familiares de Cantagalo (Rio das Ostras) dentre outras localidades.
- Isolamento e identificação dos principais agentes patogênicos que representam marcadores sanitários em amostras de mel obtidas de produtores familiares de Cantagalo (Rio das Ostras) dentre outras localidades.
- Detecção dos principais agentes patogênicos produtores de esporos causadores de intoxicação em amostras de mel obtidas de produtores familiares de Cantagalo (Rio das Ostras) dentre outras localidades.
- Realização de análises físico-químicas em amostras de mel obtidas de produtores familiares de Cantagalo (Rio das Ostras) dentre outras localidades.

## 3. JUSTIFICATIVA

As abelhas são insetos sociais que vivem em colônias, sendo a espécie *Apis mellifera L.* considerada como principal produtora do mel comumente utilizado para consumo humano (SOUZA et al., 2009)- O mel pode ser fluido ou sólido, e varia conforme a composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia e o conteúdo de água. No interior das colmeias a temperatura é de 35°C, por isso no envasamento do

mel em recipientes, deve-se trabalhar próximo a esta temperatura, para que as propriedades sejam preservadas (MARCHINI et al., 2005).

Dentre os produtos apícolas, o mel é o mais explorado pelos apicultores brasileiros, por ser um produto de larga procura e aceitação, de alto valor nutritivo, de sabor agradável e de ampla utilização pela população para diversos fins, puro ou acrescido de outros produtos apícolas, como própolis, pólen ou geleia real (BRANDÃO; BOARETTO, 1994).

Toda essa qualidade do mel, porém, nem sempre chega à mesa do consumidor. Grande parte do mel comercializado muitas vezes não teve seu padrão preservado, ou são ainda produtos totalmente estranhos, resultantes de fraudes. Muitas vezes, o mel é comercializado em embalagens inadequadas, o que pode permitir a ocorrência de alterações durante a sua vida de prateleira, comprometendo seriamente sua qualidade. Essas alterações podem resultar do crescimento microbiano, das reações de escurecimento ou de outras de natureza físico-químicas (JOSÉ EVANGELISTA, 2008).

No Brasil existe uma legislação específica para mel (BRASIL, 2000), a qual estabelece parâmetros de controle de qualidade para o produto, com indicação das análises e métodos a serem empregados. No entanto, a atual legislação brasileira para mel não contempla as características microbiológicas aceitáveis para o produto, sendo os únicos valores de referência estabelecidos pela RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), que foi revogada pela RDC 331 e constituindo na contagem de bolores e leveduras, e verificação da presença de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C. Contudo, a legislação estabelece apenas que sejam seguidas práticas de higiene adequadas na manipulação do produto. É importante ressaltar que todas as regulamentações que visam ao controle de qualidade do mel, sejam nacionais ou internacionais, consideram características de qualidade atendidas, em sua maioria, pelo mel produzido pelas abelhas *Apis mellifera* (SOUZA et al., 2009).

Considerando a importância econômica, social e cultural do mel, seu potencial para sustentabilidade e para a agricultura familiar, realizou-se este estudo com o intuito de ampliar a gama de pesquisas voltadas à avaliação de sua qualidade original. O objetivo deste trabalho foi avaliar os padrões microbiológicos e físico-químicos de méis de abelhas *Apis mellifera*, obtidos diretamente de apicultores e provenientes de varejo, buscando verificar a possível presença de contaminantes microbianos e analisar possíveis alterações nestes padrões, que possam comprometer a vida de prateleira deste produto e a sua utilização para consumo humano.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 CENÁRIOS DA APICULTURA NO BRASIL

O mel é considerado o produto apícola mais fácil de ser explorado, sendo também o mais conhecido e aquele com maiores possibilidades de comercialização. É um produto consumido mundialmente e de alta relevância na saúde humana. Além de ser um alimento, é também utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas, na fabricação de rações, como conservantes de tecidos animais e outros, devido as suas conhecidas ações terapêuticas (FREITAS et al., 2004). A criação de abelhas da espécie *Apis mellifera* para fins econômicos permite não apenas a produção de mel, mas também de cera, própolis, pólen, geleia real e apitoxina, além de possibilitar a prestação de serviços de polinização. (WIESE, 1995; CAMARGO et al., 2002; WOLFF, 2007; BEHM et al., 2012).

No Brasil, a importância da apicultura é consolidada pela multiplicidade de reservas florais, permitindo que milhares de toneladas de méis sejam produzidas atendendo assim os mercados mais exigentes (WIESE, 1993). Nosso país está colocado no ranking mundial na décima primeira posição entre os maiores produtores de mel, a China ocupa o primeiro lugar, em seguida da Turquia e Argentina (FAO, 2018). E é caracterizado por ter uma apicultura considerada livre dos grandes problemas de sanidade, como resíduos de medicamentos e pesticidas (PACHECO, 2006). Entretanto, ainda existe um grande potencial apícola (flora e clima) não explorado e existe uma grande possibilidade de se maximizar a produção, incrementando o agronegócio apícola. Para tanto, é necessário que o produtor possua conhecimentos sobre biologia das abelhas, técnicas de manejo e colheita do mel, pragas e doenças dos enxames, importância econômica, mercado e comercialização (EMBRAPA, 2003).

Em 2016, as exportações brasileiras alcançaram 24,2 milhões de toneladas de mel. O faturamento chegou a U\$ 92 milhões. A informação é do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Os Estados Unidos foram os maiores importadores: 19,7 milhões de toneladas, seguido do Canadá, com 1,5 milhão de toneladas; e Alemanha, com 1,3 milhão de toneladas. O Brasil está hoje entre os dez maiores exportadores de mel, até 2017 já havia exportado 5,3 milhões de toneladas, e faturou nada menos do que U\$ 24 milhões. Segundo o IBGE, em 2017 o ranking da produção de mel no Brasil era o seguinte: Rio Grande do Sul, em primeiro, com 15,2 mil toneladas; Paraná, com 14,3 mil toneladas; Minas Gerais, com 10,9 mil

toneladas; Piauí, com 10,6 mil toneladas; e Santa Catarina, na quinta posição, com 10,2 mil toneladas.

Como os demais produtos alimentícios, o mel deve satisfazer numerosos critérios de qualidade e certificações antes da comercialização (DEVILLERS et al., 2004). Entretanto, com o incremento de consumo de produtos naturais, o mel tem sido utilizado e comercializado mais intensamente, de modo que aumenta também a possibilidade de fraudes, adulterações e manipulação inadequada (CANO et al., 1992).

#### 4.2 AGRICULTURA FAMILIAR E SUA EXPRESSÃO NA PRODUÇÃO DO MEL

A agricultura familiar é a representação da organização da produção agrícola, florestal, pesqueira, pastoral e aquícola. Sendo a logística da produção dependente do trabalho familiar, interligando a família e a fazenda, se desenvolvendo e combinando funções econômicas, ambientais, sociais e culturais (FAO, 2013). A existência dos agricultores familiares está diretamente relacionada à preservação do patrimônio histórico e cultural do interior do Brasil e na geração de emprego no comércio e nos serviços prestados nas pequenas cidades. A agricultura familiar reúne aspectos importantes: a família, o trabalho, a produção e as tradições culturais, portanto, pode ser considerada como aquela que, ao mesmo tempo em que é proprietária, assume os trabalhos no estabelecimento. A melhoria de renda deste segmento, por meio de sua maior inserção no mercado, tem impacto importante no interior do Brasil e, por consequência, nas grandes cidades (ZOCAL et al., 2015). Apicultura é a criação de abelhas melíferas, *Apis mellifera* L., alojadas em colmeias artificiais, utilizando métodos e equipamentos desenvolvidos para melhor aproveitar a capacidade produtiva natural destes insetos (PERUCA et al., 2002).

É uma atividade de grande importância, capaz de causar impactos positivos, tanto sociais quanto econômicos, por apresentar uma alternativa de ocupação e renda para o homem do campo, além de contribuir para a manutenção e preservação dos ecossistemas existentes. A cadeia produtiva da apicultura propicia a geração de inúmeros postos de trabalho, empregos e fluxo de renda, principalmente no ambiente da agricultura familiar, sendo desta forma, determinante na melhoria da qualidade de vida e fixação do homem no meio rural. Além destes fatos pode ser caracterizado por sua fácil manutenção e por baixo custo inicial em relação às demais atividades agropecuárias (FREITAS et al., 2004). Por sua natureza, a apicultura é uma atividade econômica conservadora das espécies, devido ao baixo impacto ambiental que ocasiona, possibilitando a



utilização permanente dos recursos naturais e a não destruição do meio rural. Assim, é uma das poucas atividades preenchedora de todos os requisitos do tripé da sustentabilidade: o social, o econômico e o ambiental.

A cadeia produtiva apícola no Brasil vem gerando perto de 40 mil toneladas de mel todos os anos, obtidas a partir de 2,5 a 3 milhões de colmeias espalhadas pelo território nacional (CBA, 2016; ABEMEL, 2016A; IBGE 2014), e possibilitando que cerca de 350 mil cidadãos brasileiros, rurais e urbanos, exerçam uma atividade interessante e rentável junto à natureza. Indiretamente, a cadeia apícola nacional envolve mais de 1 milhão de pessoas, sendo que em algumas localidades do país chega a ser a principal fonte de renda familiar (CAMARGO, 2016; ABEMEL, 2016b).

A região Sudeste tem posição expressiva nesse mercado (45%), mas o estado do Rio de Janeiro é o menor produtor, apesar de apresentar grandes áreas de vegetação silvestre para a produção de mel (BRASIL, 2021). No âmbito do Rio de Janeiro, segundo Osório e Rocha (1994) afirmam que as regiões serranas, sul e centro são as que apresentam, quando observadas isoladamente, os melhores resultados em termos de produção apícola. Na baixada litorânea, embora o quantitativo de pessoas que exercem a apicultura seja o menor de todas as regiões, pode-se afirmar que a produção de mel, cera e própolis não é baixa. Ao comparar os dados da região norte e serrana, o total de pessoas exercendo a apicultura apresenta um declínio de 49,3% e de 165,8% na produção de mel.

O município de Rio das Ostras apesar de apresentar um histórico de incentivo a atividades ligadas à agricultura familiar, com crise econômica desencadeada principalmente pela queda da arrecadação dos royalties, houve uma redução dos investimentos que propiciavam a manutenção e desenvolvimento da agricultura familiar. Entre estes investimentos pode-se citar o Programa Rio Rural que disponibiliza para os agricultores o acesso a cursos de capacitação, além do financiamento de projetos, visando o incentivo a uma prática produtiva sempre associada a uma prática ambiental.

### 4.3 ASPECTOS NUTRICIONAIS E FÍSICO-QUÍMICOS DO MEL

Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2000), o mel é um produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas. As abelhas recolhem, transformam, combinam com enzimas salivares, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia. É uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose (MAPA, 2000; CODEX, 2001). Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração (MAPA, 2000; CODEX, 2001). É considerado um alimento de alto valor energético para o organismo humano (CRANE, 1987) uma vez que, 1 grama de mel contém 6,4 kcal (ETTINGER, 2002) (Tabela 01).

**Tabela 01.** Composição físico-química do mel:

<b>Componente</b>	<b>Quantidade aproximada</b>
Umidade (%)	15,8
Energia (kcal)	309
Proteína(g)	0,0
Carboidrato (g)	84
Lipídio(g)	0,0
Fibra alimentar(g)	NA
Colesterol(g)	NA
Cinzas(g)	0,1
Cálcio(g)	10
Magnésio(g)	6
Fósforo(g)	0,38
Ferro(g)	4
Sódio(g)	0,3
Cobre(g)	6
Retinol(g)	Tr
Zinco(g)	NA
Tiamina(g)	0,1
Riboflavina(g)	Tr
Niacina(g)	Tr
Piridoxina(g)	Tr
Vitamina C (g)	0,1

Fonte: TACO, 2011; NA: Não analisado; Tr: Traço.

O mel é um produto complexo, cuja composição varia notadamente em consequência da florada original, das zonas geográficas e das condições climáticas. Nas regiões tropicais, as características físicas e químicas do mel ainda são pouco conhecidas, visto que a flora apícola é bastante diversificada, associada às taxas elevadas de umidade e temperatura. Assim, a caracterização de méis é fundamental para o conhecimento de suas propriedades físicas e químicas levando-se em consideração os fatores edafoclimáticos (relativo ao solo e ao clima) e estabelecendo critérios comparativos de análise entre diversas regiões (CRANE, 1983). A diferença entre os méis depende da variedade e quantidade de plantas que florescem e produzem néctar no mesmo período (KRAMER, 1997; SILVA et al., 2004). A hipótese de que este produto possua propriedades terapêuticas tem contribuído para que seja utilizado como agente de terapia natural devido às suas ações antibacteriana, antibiótica, anticárie, anti-inflamatória, antimicrobiana, bioestimulante, depurativa, emoliente, energética, imunoestimulante e cicatrizante (MATSUNO, 1997; MOTHERSHAW; JAFFER, 2004; HORIE et al., 2004; BEKERS et al., 2004; WAILI-AL, 2004; AL et al., 2009).

A procura por produtos naturais tem gerado uma demanda crescente por produtos apícolas e, ao mesmo tempo, uma maior participação do mel na alimentação humana. Quando o mel é comparado ao açúcar comum refinado à cana-de-açúcar, o mel traz algumas vantagens, já que além de sua rica composição, ele transforma os açúcares compostos em açúcares simples, possibilitando imediata absorção pelo organismo passando seus componentes diretos para o sangue. Assim a sua utilização não será apenas para nutrição humana, mas também por ser um alimento rico em energia, que apresenta efeito imunológico, possui atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, sedativa, analgésica e expectorante (RIBEIRO, 2010).

Atualmente, o mel tem sido considerado não apenas por suas propriedades terapêuticas, mas também como suplemento alimentar sem a adição de outras substâncias durante a sua elaboração. Este fato se justifica visto que a simples análise do mel demonstra claramente a riqueza nutritiva de sua composição, que incluem micronutrientes como vitaminas e minerais. Os minerais podem ser indicadores da origem geográfica do mel quanto indicadores ambientais. As abelhas melíferas podem estar expostas aos contaminantes presentes no apiário, por isso são consideradas bioindicadores de poluição ambiental. O mineral mais encontrado no mel é o potássio, seguido pelo cálcio, magnésio, sódio, cloro, enxofre e fósforo (AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; DUTRA, 2003). Também são encontrados traços de ferro, cobre, zinco e

manganês. As vitaminas são essenciais para o crescimento e a reparação dos tecidos, vitais para o funcionamento dos órgãos e a produção das reações metabólicas específicas no meio celular, no mel são encontradas as vitaminas do complexo B e vitaminas A, E e C

O mel é ainda considerado um produto de baixo risco toxicológico, sendo raro que apresente algum efeito tóxico. Todavia, pode haver plantas que produzem méis tóxicos ou ainda a contaminação por hidroximetilfurfural quando o produto é exposto a temperaturas superiores a 35 °C por longos períodos, o que exige cuidados específicos durante a produção e processamento do mel (ZAPPALA et al., 2005; VISQUERT et al., 2004).

#### 4.4 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO MEL

Como produto de origem natural o mel de abelha africana (*Apis mellifera*), apresenta uma flora microbiana própria semelhante ao que ocorre com outros produtos alimentares, mas com um comportamento microbiológico característico. Esta microbiota pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos próprios do mel que, são introduzidos pelas abelhas na colmeia, com o néctar, pólen ou melato, ou durante a operação de limpeza por elas realizada, ao veiculá-lo sobre ou dentro de seu organismo; e os microrganismos considerados ocasionais ou acidentais, introduzidos de forma fortuita por falta de higiene na manipulação ou durante o processo de extração e beneficiamento do mel (GROSSO et al., 2002).

Embora o mel seja um produto que por suas características físicas e químicas não apresente alta susceptibilidade à proliferação de microrganismos, a ação de fatores externos (ambientais, condições de manipulação e estocagem) pode influenciar negativamente sua qualidade final (CAMARGO, 2002). Segundo a Portaria nº 367, de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os padrões microbiológicos para o mel são: ausência de coliformes totais/g em cinco amostras analisadas de um lote, ausência de *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em 25g em dez amostras de um mesmo lote e presença de no máximo 100 UFC/g de bolores e leveduras em duas amostras de cinco analisadas de um mesmo lote. Esta portaria foi revogada pela instrução normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 onde consta em anexo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do mel, entretanto, esta instrução normativa não apresenta padrões microbiológicos para mel. As características microbiológicas do mel estão relacionadas à qualidade e a segurança deste alimento. Os microrganismos indicadores sanitários de importância são primariamente leveduras, fungos

filamentosos e bactérias formadoras de esporos. Estes microrganismos estão envolvidos em atividades de deterioração do produto, através da produção de enzimas, toxinas, pela conversão metabólica do alimento, assim como pela produção de fatores do crescimento (vitaminas e aminoácidos) e fatores de inibição de microrganismos competidores (GOERZEN, 1991). As principais fontes de contaminação do mel são: os seres humanos, os equipamentos, os recipientes, a poeira, o ar, os insetos, os animais e a água.

Os microrganismos podem sobreviver no mel o que amplia a demanda pela adoção de boas práticas de fabricação como fator essencial no controle de higienicossanitário deste produto. As fontes primárias de contaminação microbiana do mel como o pólen, o trato digestório de abelhas melíferas, a poeira, o ar, a terra e o néctar são considerados de difícil controle, quando comparadas com as fontes secundárias que podem ser controladas através da implantação de boas práticas de fabricação no entreposto (MARTINS et al., 2003). As fontes secundárias incluem: a exposição ao ar durante a extração do mel; os manipuladores (infecções de pele, espirros ou contaminação fecal); as contaminações cruzadas (animais ou produtos animais) e os equipamentos (incluindo resíduos de alimento e água). Além destas, pisos, paredes e tetos, também podem ser reservatórios de microrganismos e contaminar o alimento (SNOWDON; CLIVER, 1996). Outro fator pouco considerado é o período do ciclo produtivo. A época da estação de florada pode interferir na qualidade microbiológica do mel já que, na baixa disponibilidade de alimentos, as abelhas podem forragear em colônias fúngicas (SNOWDOWN, 1999) ou mesmo em fezes e outras fontes de matéria orgânica (NOGUEIRA NETO, 1997).

A deterioração do mel é em parte o reflexo da ação de fungos filamentosos e leveduras que podem se desenvolver em condições ácidas e não são inibidas pela presença de sacarose (SNOWDON; CLIVER, 1996; RÍOS DE SELGRAD et al., 1992), sendo assim, consideradas um problema na indústria de mel. Segundo Crane (1979), o aumento da umidade e temperatura na estocagem do mel favorece o desenvolvimento de leveduras, contribuindo para a fermentação do produto. Durante a fermentação, as leveduras atacam os açúcares, produzindo álcool e dióxido de carbono. Na presença de oxigênio, o álcool pode ser convertido em ácido acético. A fermentação usualmente acontece em micro-ambientes (como no topo da embalagem) onde existe maior concentração de água (CRANE, 1979; ROOT, 1983). De acordo com White (1978), outro fator a ser considerado é que, mesmo em condições sanitárias adequadas, o processo natural de cristalização do mel promove o enriquecimento da fase líquida contribuindo, também, para sua

fermentação. Em relação aos fungos filamentosos, alguns estão associados ao conteúdo intestinal das abelhas, à colmeia e ao ambiente de forrageamento. *Aspergillus* spp foi isolado de intestinos de larvas de abelhas (HASIG; KAMBUROY, 1996), assim como os gêneros: *Atichia* spp, *Coniothecium* spp, *Hormiscium* spp, e *Triposporium* spp (SNOWDON; CLIVER, 1996). Rios de Selgrad et al. (1992) constataram que uma vez que o mel está contaminado por fungos e leveduras, estes microrganismos permanecem na forma latente, sem se multiplicarem. A proliferação de fungos pode ter como consequências: perdas econômicas por deterioração do produto e danos á saúde devido à possibilidade de serem fungos produtores de micotoxinas, como por exemplo, as aflotoxinas (MARTINS et al., 2003).

As bactérias de importância em saúde pública que têm sido isoladas a partir do mel são *Bacillus cereus* e *Clostridium botulinum*. O *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram positiva, aeróbica, formadora de esporos esféricos, e muitas estirpes são capazes de produzir toxinas. Esta bactéria é comumente encontrada em solos, vegetais, poeira, água e em vários alimentos crus e processados tais como arroz, condimentos, leites, vegetais, carnes, farináceos, sobremesas e bolos (JAY, 2005; JACQUETTE; BEUCHAT, 1998; CHRISTIANSSON et al., 1999). A intoxicação por *B. cereus* tem período de incubação geralmente curto (média de 6 a 12 horas) e a principal manifestação clínica é representada pelos vômitos persistentes, decorrentes da intoxicação pela toxina emética. Esta toxina é termoestável, resistente às proteases e aos extremos de pH, além de induzir alterações mitocondriais nos linfócitos “T helper” tipo 2 (ÁGATA et al., 2002). Outros tipos de toxinas produzidas são as enterotoxinas, responsáveis pela manifestação de diarreia e de dor abdominal; podem ser de três tipos, a hemolítica, a não hemolítica e a enterotoxina (FINLAY et al., 2002). O consumo de alimentos que contenham uma concentração superior a  $10^6$  UFC de *B. cereus*/g pode resultar em intoxicação alimentar (APHA, 2001; RHODEHANEL, 2001). Esta bactéria atualmente está entre as predominantes em surtos de intoxicação alimentar, causando diarreia e emese (FINLAY et al., 2002).

*Clostridium botulinum* é uma bactéria anaeróbica, Gram positiva, possui capacidade de esporulação, o que lhe confere resistência ao calor e mantém a sua sobrevivência em alimentos não processados. É o agente etiológico do botulismo e tem como habitat natural, o solo (SOLOMON; LILLY, 2001; JAY, 2005). Este microrganismo produz a toxina botulínica (neurotoxina) que é a mais potente toxina natural conhecida, cuja dose letal é de  $10^{-7}$  mg/k peso vivo. Esta pequena quantidade na corrente sanguínea pode causar a morte em minutos através de

paralisia muscular (SOLOMON; LILLY, 2001). A maioria dos casos de botulismo está associada ao consumo de alimentos caseiros, especialmente vegetais, frutas e peixes inadequadamente conservados (JAY, 2005; KÜPLÜLÜ et al., 2006). A intoxicação por *C. botulinum* é uma doença rara com ocorrência de 24 casos/ano nos Estados Unidos. Raramente são identificados casos de botulismo após o consumo de alimentos processados. Os alimentos enlatados, defumados ou em conserva, cujo tratamento térmico não permitiu a destruição dos esporos, também podem ser fontes de contaminação (JAY, 2005).

O botulismo é uma enfermidade que resulta da ação de uma potente neurotoxina de origem proteica, produzida pelo *Clostridium botulinum*, normalmente decorrente da ingestão de alimentos, em que a toxina foi previamente elaborada pela bactéria (POLAQUINI et al., 1997; GELLI et al., 2002). A toxina causa quatro tipos reconhecidos de enfermidades em humanos, incluindo botulismo alimentar, botulismo por feridas, colonização intestinal em adultos e botulismo infantil. O botulismo alimentar ocorre pela ingestão da toxina pré-formada, enquanto que, nos outros três tipos, a enfermidade ocorre pela infecção, multiplicação e produção de toxinas produzidas pelo *Clostridium* spp. em feridas ou no trato gastrointestinal (CARDOSO et al., 2004; KEET & STROBER, 2005). A absorção da toxina na forma de aerossol através do trato respiratório é outra via de intoxicação, mas somente oferece riscos em situações de guerra biológica ou bioterrorismo (FREAN et al., 2004).

O botulismo infantil, também conhecido como botulismo de lactentes (associado à Síndrome de Morte Súbita do Recém-Nascido), ocorre em crianças muito jovens devido à absorção de toxina produzida in vivo, no intestino da criança. A ausência de microbiota de proteção permite a germinação dos esporos e a produção da toxina na luz intestinal e, por isso, ocorre com maior frequência em crianças com idade entre 3 a 26 semanas (lactentes). Por estar amplamente distribuída no ambiente, a bactéria pode contaminar o mel por meio do néctar, pólen, cera, a própria abelha e as práticas de manejo adotadas pelo apicultor. Estimativas indicam que até 15% do mel em todo o mundo esteja contaminado com esporos do *Clostridium botulinum*.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família *Staphylococcaceae* (FRANCO e LANDGRAF, 2005), imóveis, não esporulados, capsulados ou não, anaeróbios facultativos, e que visualizados em microscópio aparecem em sua grande parte na forma de cachos. Possuem metabolismo respiratório e fermentativo (BENNETT e MONDAY, 2003) e com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então produzem catalase

(FRANCO e LANDGRAF, 2005), sendo classificadas como espécies catalase positivas. Além disso, os estafilococos utilizam uma variedade de carboidratos e requerem fontes de nitrogênio (BENNETT e MONDAY, 2003).

Dentre as espécies que fazem parte do gênero *Staphylococcus*, a espécie *S. aureus* certamente é a que se atribui maior grau de relevância. O crescimento e proliferação do *S. aureus* em alimentos representa um risco a saúde do consumidor, considerando a produção de enterotoxinas. A razão primária para a sua busca e para sua identificação é a tentativa de rastrear se houve contaminação pós-processamento (BENNETT e MONDAY, 2003), assim como fontes de contaminação secundárias que indicam práticas de higiene e manipulação inadequadas (REIBNITZ, TAVARES e GARCÍA, 1998). O homem é o principal reservatório de *S. aureus* e os percentuais de colonização variam de 60 a 70% (SANTOS, 2000). Santos, (2000) constatou que a frequência de portadores de *S. aureus* é alta e, tratando-se de indivíduos que manipulam alimentos, este fato constitui-se um elemento vital na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica, desde que estejam infectados com cepas produtoras de enterotoxinas.

É elevado o envolvimento do *Staphylococcus aureus* em casos ou surtos de intoxicação ocasionados pela ingestão alimentar contendo enterotoxinas, e surtos atribuídos à contaminação com estafilococos ocorreram em diversas localidades ao longo dos séculos XIX e XX (BENNETT e MONDAY, 2003).

Outro grupo de microrganismo de relevância sanitária, é o grupo dos coliformes totais e fecais. A denominação “coliformes fecais” foi utilizada durante muitos anos para descrever coliformes que fermentavam a lactose com produção de gás a 44,5°C. *Escherichia coli* e algumas cepas de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. apresentam esta característica de termotolerância, porém, somente *E. coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais (SILVA; CAVALLI, OLIVEIRA, 2006). *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. podem ser encontradas em outros ambientes, como vegetais e solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogênicas de origem intestinal (DOYLE, 1996).

Em geral, o grupo dos coliformes, é utilizado para avaliar o *status* sanitário dos alimentos. Contudo, eles podem ser usados para avaliar aspectos gerais de qualidade, uma vez que são rotineiramente empregados para avaliar a qualidade do produto final e a higiene empregada no seu processamento (SANT’ANA et al., 2003).



Dentre os grupos de microrganismos indicadores destaca-se como melhor indicador de contaminação fecal a *Escherichia coli* (JAY, 2005), por ser de fácil isolamento nos meios de cultura convencionais e mais resistente por um maior período de tempo (SOUZA, 2006). Esta bactéria tem uma tendência de se modificar de organismo comensal para um patógeno oportunista e para uma bactéria extremamente especializada (HART; WINSTANLEY, 2001), ocasionando doenças em hospedeiros saudáveis; por isso, é desejável a determinação de sua incidência em uma população de coliformes (JAY, 2005). O trato gastrointestinal humano é suscetível a infecções alimentares, sendo seus principais agentes causadores representados por membros da família Enterobacteriaceae. Dentre as bactérias dessa família têm destaque fundamental as categorias diarreio gênicas de *E. coli*. Suas infecções são limitadas à colonização de superfícies mucosas ou podem se disseminar através do organismo, tendo sido implicadas, além dos processos de infecção, também em casos de meningite (NATARO; KAPER, 1998).

Outro grupo de microrganismo de relevância sanitária é representado pelo gênero *Salmonella* spp. que é amplamente distribuído na natureza, sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório natural. Em função da sua capacidade de disseminação no meio ambiente, essa bactéria pode ser isolada de locais variados, e conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares. Pode ainda ser veiculada pelo próprio homem, sem sintomas clínicos, sendo neste caso caracterizada a condição de portador assintomático (CARDOSO, 2006).

A segurança alimentar é uma questão com importância crescente em saúde pública, e os governos de todo o mundo têm intensificado seus esforços visando melhorias (WHO, 2007). Portanto, é necessária a prevenção dessas doenças veiculadas por alimentos, através de instituição de medidas preventivas eficazes e de treinamento, aliadas à implantação de boas práticas de higiene, desde o campo até o consumidor final, o que irá contribuir para a minimização de contaminação e/ou crescimento bacteriano indesejado em produtos alimentícios, incluindo o mel (SOUZA, 2006).

## **5. METODOLOGIA**

### **5.1. AMOSTRAGEM**

Neste estudo avaliou-se um total de seis amostras de mel obtido durante o período de outubro 2019 e como parte da proposta metodológica do projeto de IC/UFRJ “Mapeamento das condições higienicossanitárias do mel proveniente da agricultura familiar do distrito de

Cantagalo- Rio das Ostras e adjacências.” e de projetos de extensão sob coordenação de professores do curso de nutrição e farmácia da UFRJ *Campus* Macaé. As amostras foram obtidas em frascos de 250 ml ou em garrafas de vidro de um litro, produzidas em unidades familiares localizadas no distrito de Cantagalo-Rio das Ostras. Durante a etapa de coleta das amostras observou-se o estado das embalagens e o modo de armazenamento. As amostras foram enviadas para o laboratório de Microbiologia de alimentos do Polo Ajuda UFRJ *Campus* Macaé para as análises microbiológicas.

As amostras de mel foram manipuladas em cabine de segurança biológica, tendo a superfície da embalagem de mel desinfetada com algodão embebido em álcool 70% e aberta assepticamente. Em seguida, foram pesados 25g da amostra de mel e transferidos para um erlenmeyer contendo 225ml de água peptonada 0,1%, sendo esta mistura homogeneizada por três minutos. A partir desta diluição (1/10), as suspensões foram semeadas em meios próprios para o tipo de microrganismo que se pretendia isolar. As análises microbiológicas foram determinadas através da metodologia preconizada pelo APHA (*American Public Health Association*).



**Figura 1:** Três amostras iniciais de mel analisadas.

## 5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE MARCADORES HIGIENICOSSANITÁRIOS DO MEL

As análises microbiológicas compreenderam os testes de contagem de bactérias mesófilas, enumeração de Coliformes Totais e Fecais a 45 °C, fungos filamentosos e leveduras, *Staphylococcus* coagulase-positivos, *Clostridium* spp. sulfito redutores, *Bacillus cereus* e pesquisa de *Salmonella* sp..

### 5.2.1. Contagem padrão de bactérias mesófilas heterotróficas aeróbias estritas e facultativas viáveis

As amostras foram diluídas em água peptonada 0,1%, homogeneizadas, submetidas a diluições decimais seriadas e plaqueadas, pela técnica *Pour Plate*, em Ágar Padrão para Contagem (PCA) bacteriana. As placas foram incubadas à  $36 \pm 1$  °C durante 48 horas (ISO 4833,2003). Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por volume expresso em mL segundo APHA (2001).

### 5.2.2. Contagem de coliformes totais e termotolerantes pela técnica dos tubos múltiplos

O teste presuntivo para as amostras de mel foi realizado empregando-se o Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Neste teste três alíquotas de três diluições da amostra foram inoculadas em uma série de três tubos do LST por diluição. As amostras foram incubadas a 35 °C por 24 a 48 horas em estufa bacteriológica. As diluições que apresentarem reação presuntiva positiva, evidenciada pela mudança de coloração do meio e produção de gás, foram submetidas ao teste confirmatório de coliformes totais em tubos contendo 10 mL de Caldo Lactose Verde Brilhante Bile 2% (VBBL) e incubação a 35 °C por 24/48 horas. Para a confirmação de Coliformes Termotolerantes alíquotas das diluições positivas foram repicadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de Caldo EC e incubadas em banho-maria a  $44,50 \pm 0,2$  °C por 24/48 horas, considerando-se positivos os que apresentaram turvação e retenção de gás no tubo de Durham (BRASIL, 1997; BRASIL, 2018). As amostras positivas para Coliformes Termotolerantes foram isoladas em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e submetidas às provas de caracterização bioquímica para confirmação de *Escherichia coli* (KONEMAM et al., 2008). O número de tubos positivos tanto no Caldo VBBL quanto no Caldo EC foram conferidos nas tabelas de NMP, e os resultados expressos em NMP/g.

### 5.2.3. Detecção de bolores e leveduras

As amostras foram diluídas em água peptonada alcalina a 0,1% (APA), homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas e plaqueadas, pela técnica *Spread Plate*, em ágar batata glicose 2% acidificado a pH 3,5 (BDA). As placas foram incubadas à  $25 \pm 1$  °C durante 5-7 dias. Os resultados foram expressos em UFC por volume expresso em mL (ISO 21527-1,2008).

#### 5.2.4. Contagem e Identificação de *Staphylococcus* spp.

As amostras foram diluídas em água peptonada alcalina a 0,1% (APA), homogeneizadas e submetidas a diluições decimais seriadas e plaqueadas, pela técnica *Spread Plate* em Ágar Baird Parker para enumeração de *Staphylococcus* spp.. As colônias típicas negras com halo duplo de lipólise foram semeadas em Ágar Manitol Vermelho de fenol a 7,5% de cloreto de sódio (NaCl), para observação dos aspectos morfo-tintórias pela técnica de coloração de Gram, prova da coagulase e demais testes fenotípicos para caracterização do gênero e espécie. A identificação foi efetuada por meio dos seguintes procedimentos padronizados: prova da catalase e do hidróxido de potássio (KOH), de redução de nitratos, *Voges-Proskauer*, produção de urease, DNase e fermentação de açúcares (ISO 6888-1, 2003).

##### 5.2.4.1. Prova da Coagulase

O teste de coagulase foi realizado através da adição de 0,1 mL de caldo BHI, incubado por até 18h, com colônia suspeita a um tubo de ensaio com 0,5 ml de plasma de coelho acrescido de EDTA. Os tubos foram incubados em estufa a 35 °C por 4, 18 e 24 horas. Após a incubação foi observada a formação de coágulo pela inclinação suave do tubo de ensaio a 90<sup>0</sup> da vertical para confirmação da presença de coágulo livre (ANVISA, 2004).

##### 5.2.4.2. Provas de *Voges-Proskauer*, Fermentação da maltose e do manitol e Redução de nitratos

A prova de *Voges-Proskauer* foi realizada a partir do caldo APGF que apresenta na sua composição glicose, peptona, água e fosfato. A utilização da glicose, apresentando como produto final a acetoína é indicada pela coloração rosa após a adição de 0,3 ml de  $\alpha$ -naftol a 5% e 0,6 ml de KOH (40%) no caldo contendo o inóculo incubado por 24 horas a 37°C.

A fermentação da maltose e do manitol foi testada a partir da inoculação dos isolados em caldo contendo o indicador de pH vermelho de fenol e o açúcar maltose ou manitol à 1% em cada tubo, seguidos do acréscimo de uma fina camada de lugol estéril. A produção de ácido, indicada pela diminuição do pH e consequente mudança de cor, foi avaliada após 24 horas na temperatura de 37 °C.

Para avaliação da redução de nitrato, foi utilizado caldo contendo nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>). A leitura da redução do nitrato a nitrito foi realizada adicionando-se em uma lâmina, uma gota do caldo inoculado após 24 horas a 37 °C e, uma gota de cada reativo (A e B) de *Griess Ilosway*. A coloração rosa indica presença de nitrito no caldo e, consequentemente prova de redução positiva (KONEMAN et al. 2008). Para comparação e controle dos testes foi utilizada a

cepa padrão ATCC de *S. aureus* 25923 obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

#### 5.2.4.3. Produção de Urease

A presença de urease detecta-se quando o microrganismo cresce num meio com ureia (meio de ureia de *Christensen*) que contém também o indicador de pH, vermelho de fenol. Quando a ureia é desdobrada pela urease, a amônia acumula-se no meio tornando-o alcalino. Este aumento de pH faz com que o indicador de pH passe de amarelo a rosa, sendo uma reação positiva para a presença de urease. A ausência da coloração rosa indica uma reação negativa. Para comparação e controle dos testes foi utilizada a cepa padrão ATCC de *S. aureus* 25923 obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

#### 5.2.4.4. Detecção da enzima DNase

Este teste consiste na inoculação dos isolados de *Staphylococcus* spp. em meio contendo DNA, (DNase *Test Agar*) obtido comercialmente, acrescido de azul de ortotoluidina na concentração de 0,1% para que o meio adquira uma coloração azul. Posteriormente foram incubados a 35°C por 24 horas para observação de um halo transparente ao redor das colônias produtoras de DNase, como indicador de positividade da prova (ANVISA, 2004). Para comparação e controle dos testes foi utilizada a cepa padrão ATCC de *S. aureus* 25923 obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ.

#### 5.2.5. Contagem de *Bacillus cereus*

Uma alíquota de 0,1 ml da diluição  $10^{-1}$  foi semeada em duplicata, de acordo com o método de *spread plate* (Figura 3), em superfície de placas de Petri descartáveis estéreis contendo meio seletivo para *Bacillus cereus* (MYP / microMed). As placas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas. Posteriormente, a identificação presuntiva das colônias foi realizada de acordo as características de crescimento das colônias, observando-se a formação de zonas de precipitação ao redor da colônia indicando a produção de lecitinase e a ocorrência ou não, da fermentação do manitol. As colônias suspeitas foram transferidas para tubos contendo Agar Nutritivo (MicroMed<sup>®</sup>) inclinado e incubado a 30°C por 24 horas, posteriormente foram realizados testes para identificação (APHA, 2001; KONEMAN et al., 2001; RHODEHAMEL, 2001).

#### 5.2.6. Contagem de *Clostridium spp.* sulfito-redutor

Foram utilizados dois meios de enriquecimento, caldo de carne cozida (CMM/ BBL) e caldo tripticase - peptona - glicose - extrato de levedura (TPGY) (KÜPLÜLÜ et al., 2006; RALL et al., 2003; SOLOMON; LILLY, 2001). Em cabine de segurança biológica, foram retiradas quatro alíquotas de 2ml de cada amostra de mel, as quais foram inoculadas em duplicata, em 15ml de cada caldo de enriquecimento. Imediatamente, todos os tubos foram levados para banho-maria (90°C) por 15 minutos e resfriados em banho de gelo. Os tubos que continham CMM serão incubados a 35°C (cepas proteolíticas) e, os de TPGY a 28°C (cepas não proteolíticas) por sete dias. Os caldos que não apresentaram crescimento durante os sete dias, foram novamente incubados por mais 10 dias. Aqueles que não apresentaram crescimento nesse período foram considerados negativos (RALL et al., 2003; SOLOMON; LILLY, 2001). Após o período de incubação, as culturas foram observadas quanto à turbidez, produção de gás, digestão das partículas de carne no caldo CMM e odor. Após essa caracterização, as suspensões foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintoriais, bastonetes Gram positivos esporulados, similares a raquete de tênis (RALL et al., 2003; SOLOMON; LILLY, 2001). Para eliminar a microbiota indesejada, nos tubos com crescimento positivo, foi realizado o seguinte procedimento: em cabine de segurança biológica, serão retirados 2ml do caldo de enriquecimento que apresentava células características e adicionados em um volume igual etanol filtrado em Millipore 0,22 µm. Esta suspensão foi incubada em temperatura ambiente por uma hora (RALL et al., 2003; SOLOMON; LILLY, 2001). Em seguida, uma alíquota desta suspensão foi estriada, em duplicata, em Agar Sulfito Polimixina-Sulfadiazina (SPS - Vetec) acrescido de 5% de emulsão de gema de ovo para obtenção de colônias isoladas (MONETTO et al., 1999). As placas foram incubadas em jarra de anaerobiose a 35° C por 48 horas. As colônias típicas (curva ou plana, lisa ou áspera e com zona de precipitação) foram re-isoladas em duplicata no Agar SPS, sendo uma placa incubada em ambiente aeróbio e outra em anaerobiose, ambas a 35°C por 48-72 horas. As colônias que apresentaram crescimento apenas em anaerobiose foram consideradas positivas (RALL et al., 2003; SOLOMON; LILLY, 2001).

#### 5.2.7. Detecção de *Salmonella sp.*

Para detectar *Salmonella* as amostras foram homogeneizadas em água peptonada alcalina a 0,1% (APA) e após incubação por 16-20 horas a  $36 \pm 1$  °C, alíquotas de 1 e 0,1 mL foram

transferidas para caldo Selenito cistina, Rappaport Vassiliadis e Tetrionato de Sódio, respectivamente. Depois da incubação durante 24-30 horas a  $41 \pm 0,5$  °C em banho-maria, foi realizado isolamento em meios seletivos: ágar XLD e SS com incubação por 18-24 horas a  $36 \pm 1$  °C (ISO 6579,2002), para observação das características típicas de *Salmonella* spp..

### 5.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA QUALIDADE DO MEL:

#### 5.3.1. Determinação de umidade

A umidade do mel foi determinada de acordo com a metodologia da AOAC (1997). O princípio deste método consiste na determinação do índice de refração do mel a 20 °C, que é convertido para umidade através da tabela de referência de Chataway. (Tabela 3).

Inicialmente foi transferido de 3 a 4 gotas da amostra para o prisma do refratômetro. Em seguida, foi realizada a leitura do índice de refração a 20 °C.

#### 5.3.2. Sólidos solúveis totais

Foi determinado por leitura direta das amostras em refratômetro de bancada, do tipo Abbe, segundo a técnica estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Os sólidos solúveis têm correspondência direta com todas as substâncias que se encontram dissolvida em um determinado solvente. São denominados como °Brix e tem tendência de aumento com a maturação.

#### 5.3.3. Determinação da acidez

O teor de acidez do mel foi obtido por titulação do filtrado com NaOH 0,1N, segundo a técnica estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo os resultados expresso em meq.kg<sup>-1</sup>. Inicialmente foi pesado 10g de cada amostra em erlenmeyers de 250 ml onde se adicionou 50 ml de água destilada. Em seguida, foi adicionado de 2 a 4 gotas de fenolftaleína e foi feita a titulação com solução de hidróxido de sódio, com a concentração de 0,1062 mol/l, até atingir a coloração rósea. Anotou-se o volume gasto e fez-se o cálculo de acordo com a equação abaixo:

Acidez em meq/kg =  $V \times f \times 10$ , onde f é o fator da solução de NaOH 0,1 mol/L e V é o volume gasto na titulação.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

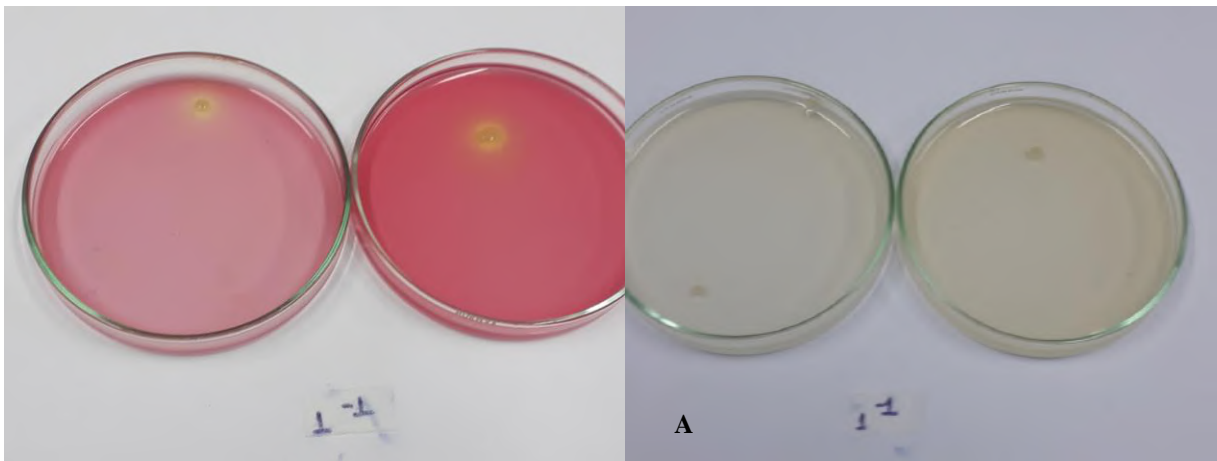
Foram analisadas um total de seis amostras de dois lotes de mel distintos, e para todas estas houve ausência total de *Clostridium* sulfito redutores, *Salmonella* spp. e grupo de coliformes totais e fecais. Para as demais análises foram obtidos resultados de isolamento positivos, porém as contagens foram inferiores ao critério de confiança, que estabelece um número mínimo de 25 UFCs. A tabela 02 apresenta os resultados das análises microbiológicas para avaliação do perfil higienicossanitário do mel em questão e as discussões serão apresentadas a diante.

**Tabela 02.** Análises microbiológicas para avaliação do perfil higienicossanitário das seis amostras de mel provenientes da agricultura familiar de Cantagalo-Rio das Ostras e adjacências.

	Mesófilas UFC/mL	<i>Bacillus cereus</i> UFC/mL	<i>Staphylococcus</i> spp coagulase- positivos UFC/mL	<i>Clostridium</i> spp. sulfito- redutores UFC/mL	Fungos e leveduras	<i>Salmonella</i> sp. Em 25 mL de amostras	Coliformes Totais e Col. a 45°C
<b>1</b>	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0
<b>2</b>	$\leq 10^1$	0/0	$\leq 10^1$	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0
<b>3</b>	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0
<b>4</b>	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	0/0	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0
<b>5</b>	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	$\leq 10^1$	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0
<b>6</b>	$\leq 10^1$	0/0	0/0	0/0	$\leq 10^1$	*	0/0

1-4: Amostras de mel dos municípios de Cantagalo (Rio das Ostras), \*: ausência de *Salmonella* sp. Em 25 mL de amostra de mel analisada. 0/0: contagem e isolamentos negativos para as respectivas análises realizadas em duplicata.  $\leq 10^1$ : crescimento microbiano positivo, porém inferior a 25 UFC/mL.





**Figura 2:** A: Contagem de *Bacillus cereus* em Ágar MYP após incubação a 37°C/24-48h; B: Contagem de Bactérias mesófilas em Ágar PCA após incubação a 37°C/24-48h;

#### 6.1.1. Contagem total de bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias estritas e facultativas

Resultados obtidos nas contagens de mesófilas foram menores ou iguais a  $10^1$  nas seis amostras analisadas. Sabe-se que a contagem de bactérias mesófilas é importante porque inclui a maioria dos contaminantes dos alimentos de origem animal, podendo atingir contagens altas quando o alimento é mantido à temperatura ambiente, discordando das normas para a conservação do alimento (SILVA, 2002).

Os resultados obtidos no presente trabalho, foram similares a de algumas amostras analisadas por Schlabit et al. (2010), quando avaliavam a qualidade microbiológica do mel comercializado na região do Vale do Taquari/RS, onde obtiveram resultados variando de  $1 \times 10^1$  à  $2,7 \times 10^2$  UFC/ml para 12 amostras analisadas. De acordo com o ICMS (2002) o número de microrganismos aeróbios mesófilos detectados em alimentos tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade mais comumente utilizado como indicadores de adequação das técnicas de limpeza, de desinfecção e do controle do binômio tempo/temperatura durante o processamento, transporte e estocagem. Esta importância se justifica pela grande maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar fazerem parte deste grupo (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Esse indicador microbiano permitirá também a obtenção de informações sobre as alterações deteriorantes e da validade comercial. Portanto, a baixa contagem destes indicadores reflete condições higiênicas adequadas e também desfavoráveis para a multiplicação de microrganismos potencialmente patogênicos para o consumo humano (LIRA, PEREIRA, 2001; ATHAYDE, 2001; SILVA, 2002).

### 6.1.2. Contagem de *Bacillus cereus*

Os resultados obtidos no presente estudo detectaram que em apenas duas amostras não houve crescimento típico de *Bacillus cereus*, enquanto nas demais amostras de mel a contagem foi menor ou igual a  $10^1$  UFC/g.

Em estudo realizado na Argentina por Iurlina et al., (2006), foi detectado a prevalência de bactérias do gênero *Bacillus* em diferentes produtos e constatado que no universo de 70 amostras de méis analisadas, 27 (38,6%) apresentavam tal contaminação e 23% de todas as amostras de méis apresentavam contaminação específica por *Bacillus cereus*. López e Alippi (2007) constataram incidência de contaminação por *B. cereus* de 27% em amostras de méis argentinos. Martins, Martins e Bernardo (2003) analisaram 80 amostras de méis, constatando somente seis amostras com contagens de *B. cereus* acima de 10<sup>3</sup> esporos/g. As patologias associadas a esta espécie se dão quando o alimento possui uma contagem superior a 10<sup>6</sup> células viáveis/g, que propicia a síntese de enterotoxinas associadas aos quadros clínicos (BAM, 2002a). Apesar da discrepância de tais resultados que demonstram a presença desta bactéria de forma intensa, no presente estudo obtivemos uma contagem bem reduzida de colônias de *Bacillus cereus*. Logo, as amostras foram consideradas seguras para o consumo e pode-se inferir que houve o cumprimento dos padrões higienicossanitários preconizados pela legislação.

### 6.1.3. Contagem e identificação de *Staphylococcus aureus*

Um total de 66,67% (4/6) das amostras de mel apresentaram contagem menor ou igual a  $10^1$  de colônias típicas de *Staphylococcus* que foram posteriormente submetidas a caracterização bioquímica, não havendo a detecção da espécie *S. aureus*. Em 33,33% (2/6) aproximadamente não houve crescimento de colônias bacterianas típicas de *Staphylococcus* coagulase-positivos. De forma semelhante ao presente estudo, Santos (2013) detectou a ausência de *Staphylococcus aureus* nas amostras de méis analisados.

O baixo pH comumente encontrado em méis, pode ter contribuído para a ausência desses microrganismos, uma vez que a faixa ótima para seu desenvolvimento é de 4,2 a 9,3 (SILVA et al., 2010). Normalmente, quando *S. aureus* estão presentes em alimentos, apresentam contagem acima de  $10^6$  UFC/g, e frequentemente ocasionam intoxicação (SALOTTI et al., 2006).

A contaminação por *Staphylococcus aureus* em méis provém majoritariamente de fontes secundárias. A contaminação pós-processamento de alimentos é comum, devido ao contato

humano com o alimento já processado ou exposição a superfícies inadequadamente sanitizadas (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001)

#### 6.1.4. Contagem de *Clostridium spp.* sulfito-redutores

Nas análises para detecção e contagem de *Clostridium spp.* sulfito-redutores não houve crescimento típico em meios de cultivo seletivo e nas técnicas preconizadas pela literatura. Diversos estudos relatam a prevalência de *Clostridium spp.* em amostras de mel e discordam dos resultados do presente estudo que detectou a ausência deste grupo. Rall et al. (2003) detectaram a presença de *Clostridium botulinum* em 3% das 100 amostras analisadas no Estado de São Paulo. Schocken-Iturrino et al. (1999) analisaram 80 amostras de mel brasileiro das quais, seis (7,50%) estavam contaminadas com *C. botulinum*. Küplülü et al. (2006), analisaram 88 amostras turcas, das quais seis (6,80%) estavam contaminadas com esporos de *C. botulinum*. Na França, Delmas et al. (1994) isolaram *C. botulinum* em 6,7% das amostras analisadas. Nevas e colaboradores (2005) analisaram 529 amostras de mel dos países nórdicos, sendo que em 83 (15,69%) destas foi detectada a presença de *C. botulinum*.

#### 6.1.5. Contagem de fungos filamentosos e leveduras

Nas seis amostras de mel analisadas, obteve-se uma contagem maior ou igual a  $10^1$ , estando, portanto dentro dos limites preconizados pela Portaria nº 367, de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece o limite máximo de  $1,0 \times 10^2$  UFC/g. Esta portaria foi revogada pela instrução normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 onde consta em anexo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do mel, entretanto, esta instrução normativa não apresenta padrões microbiológicos para mel.

As contagens para esses microrganismos no presente estudo foram menores do que as relatadas na literatura. Sodré et al. (2007) detectaram a contagem de  $1,7 \times 10^4$  e Schlabit  et al. (2010) que avaliando a qualidade microbiológica dos méis de *Apis mellifera* relataram o valor de  $2,7 \times 10^2$  UFC/g. Neris et al. (2013) detectaram presença de bolores e leveduras com resultados superiores a  $7,38 \times 10^2$  (UFC/g) em méis comercializados no estado do Maranhão.

Os estudos de Rios de Selgrad et al. (1992) concluíram que uma vez o mel estando contaminado por fungos e leveduras, estes microrganismos permanecem na forma latente, sem se multiplicar. A baixa contagem de fungos reportada por Piana et al. (1991) sugere que os fungos podem sobreviver, mas não tendem a crescer no mel. A presença de fungos filamentosos no

produto final pode estar relacionada à sua capacidade em suportar concentrações elevadas de açúcar, acidez e as propriedades antimicrobianas do mel. Os bolores mais encontrados no mel são os do gênero *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*, os quais podem produzir metabólitos tóxicos. As leveduras podem crescer em condições de baixo pH e não são inibidas pela sacarose. A presença de leveduras osmofílicas no mel é um problema, pois o seu crescimento apenas está limitado pela quantidade de água disponível. Algumas condições, tais como, o aumento da umidade, temperatura moderada, granulação, e contagem elevada de leveduras favorecem a fermentação do mel (PEREIRA, 2008).

#### 6.1.6. Pesquisa de *Salmonella* spp

Em todas as seis amostras obtiveram-se como resultado, ausência de *Salmonella* spp., estando em conformidade com a legislação brasileira (BRASIL, 2000) que somente prevê ausência de *Salmonella* spp. em 25 g do produto. Os resultados obtidos no presente estudo estão em consonância com os demais trabalhos disponíveis na literatura que demonstram ausência de *Salmonella* spp. nas amostras de mel, e atendimento aos padrões microbiológicos legais. Desta forma, citamos os estudos desenvolvidos por Schlabitz (2010), que diagnosticou méis da região do Vale do Taquari – RS e Wanderley (2014), a partir de méis comercializados em Sousa – PB, e detectaram em seus trabalhos resultados onde houve a ausência de *Salmonella* spp..

A qualidade microbiológica de determinado alimento incluindo mel está relacionada diretamente com as condições higiênicas de produção e manipulação das amostras e a forma de armazenamento, envolvendo, portanto, um contexto mais social do que botânico e, por se tratar de um microrganismo patogênico, requer atenção e remete à contaminação cruzada do produto através da sua manipulação (FRANCO 2008). As espécies do gênero *Salmonella* apresentam a capacidade de disseminação no meio ambiente, sendo esta bactéria isolada de locais variados, e conseqüentemente, de diversas matérias-primas alimentares, podendo ainda ser veiculada pelo próprio homem sem sintomas clínicos (JAKABI et al., 1999). O gênero é considerado como o principal agente causador de doenças de origem alimentar, podendo causar infecção (TESSALI et al., 2003).

#### 6.1.7. Contagem de coliformes totais e coliformes Termotolerantes

Nas seis amostras analisadas obteve-se contagem inferior a <3,0 NPM/g de coliformes totais e coliformes termotolerantes atendendo os padrões estabelecidos pela Instrução Normativa

nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA que estabelece ausência (<3,0 NPM/g) para coliformes totais.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram encontrados por Pires (2011), que verificou a qualidade microbiológica dos méis de abelhas *Apis mellifera* produzido no Piauí. Em todos os méis avaliados, não foi detectada a presença de microrganismos do grupo dos coliformes. Souza et al. (2012), ao avaliarem as características microbiológicas de 21 méis produzidos na Região Nordeste do Estado da Bahia, encontraram valores < 3,0 NMP/g. E por Silva (2016), que analisando méis de Roraima, em todas as amostras analisadas não foi encontrada a presença destes coliformes. Wanderley (2014) caracterizou microbiologicamente amostras de méis *Apis mellifera* produzidos na região de Sousa-PB. Em todas não foi detectada a presença de microrganismos do grupo dos coliformes. Santos et al. (2011) desenvolveram um trabalho no qual encontraram os valores <3,0 NMP/g. Estes valores estão em conformidade com a legislação.

Os microrganismos pertencentes ao grupo dos coliformes podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica de produtos em relação à vida de prateleira ou à segurança. A presença desta microbiota no mel pode ser atribuída à manipulação inadequada, observada no momento da colheita das amostras e durante o envase, ou por condições inapropriadas de temperatura durante a produção ou conservação do produto, além do fato da utilização de frascos não esterilizados (LIMA 2012).

## **6.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS**

Foram avaliadas um total de seis amostras de mel de dois lotes distintos e os resultados obtidos destas análises físico-químicas estão apresentados na tabela 03.

**Tabela 03.** Análises físico-químicas das seis amostras de mel provenientes da agricultura familiar de Cantagalo-Rio das Ostras e adjacências.

<b>Amostras</b>	<b>Temperatura</b>	<b>°Brix</b>	<b>Umidade</b>	<b>Acidez</b>
<b>1</b>	23,5° C	79,60	18,6	64,79
<b>2</b>	22° C	79,90	18,4	60,01
<b>3</b>	24° C	80,00	18	27,35
<b>4</b>	23,5° C	80,00	18	82,19
<b>5</b>	26° C	79,90	18	29,83
<b>6</b>	27° C	79,00	18,8	45,36

### 6.2.1 Umidade

As análises de umidade das amostras de mel detectaram um teor médio de 18,3%, e variaram entre de 18% a 18,8% (Tabela 2). Esses valores se encontram abaixo do limite máximo permitido pela legislação vigente, que estabelece um critério de 20% segundo o estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2000) (Anexo I).

Semelhantemente, as análises dos méis da Paraíba obtiveram os resultados entre 17,59 a 20,3% (RODRIGUES et al, 2005). Silva et al (2004) analisando méis do Piauí, encontraram teores de umidade que variaram de 17,6 a 19,7%. As condições climáticas no dia da colheita e extração do mel influenciam seu conteúdo de água, já que é um produto higroscópico, ou seja, absorve água (SILVA et al, MEIRELES, S.; CANÇADO, I.A.C. 212 2004). Teores de água acima de 20% indicam que o mel foi colhido antes de ficar “maduro” (não operculado) ou sofreu adição de água devido a processamento indevido (LEAL, SILVA e JESUS, 2001). Quanto maior o conteúdo de água do mel, mais esse se torna propício à fermentação indesejada (BERTOLDI, GONZAGA e REIS, 2004). O teor de água é um parâmetro de qualidade importante, pois permite dizer a duração do produto, conservação, palatabilidade, estabilidade do mel e sua fermentação. Quanto maior for o teor de água, maior é a probabilidade de o mel fermentar durante o seu armazenamento. Como produto higroscópico, o mel pode absorver e reter umidade durante a extração em dias úmidos e com o armazenamento inadequado e em embalagens mal fechadas. (VARGAS, 2006).

### 6.2.1. Acidez

Os valores da acidez para as seis amostras de mel analisadas variaram entre 27,35 a 82,19 meq.kg-1, com média de 51,83 meq.kg-1, estando apenas 50% das amostras em conformidade com os parâmetros preconizados pelo o *Codex Alimentarius* (2001), que estabelece a acidez máxima de 50 meq.kg. A legislação Brasileira, estabelece um limite máximo de 60 meq.kg-1 de acidez para o mel de abelha (Brasil, 2000). Os resultados deste presente trabalho segundo as duas literaturas são similares, 50% das amostras estariam em conformidade aos padrões preconizados.

Resultados um pouco inferiores foram obtidos por Noronha (1997) e Melo (2002). Cortopassi-Laurino & Wirse (2007), que determinaram uma média de acidez livre para méis de 44,61 meq.kg-1 para o mel de abelha elaborado a partir da florada de citrus. Conforme trabalho realizado por Horn (1996), o resultado médio de acidez de méis de abelhas melíferas provenientes de quatro regiões brasileiras foi de 37,1 meq.kg-1. De acordo com esse autor, a acidez do mel está relacionada principalmente ao ácido glucônico, produzido pela enzima glicose-oxidase sobre a glicose. A ação dessa enzima se mantém mesmo após o processamento, permanecendo, dessa forma, em atividade durante o armazenamento do mel (VENTURINI, 2007). Outros fatores que podem ser atribuídos à acidez do mel seriam a ação das bactérias durante a maturação e os íons inorgânicos presentes na composição desse produto apícola, como o fosfato e cloreto (WHITE, 1975; REGINATO, 2004). O grau de acidez detectado nas amostras do presente estudo pode ter uma relação com a detecção de leveduras obtidas nas análises microbiológicas. A determinação da acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício (IAL, 2008), visto que as leveduras são microrganismos que podem crescer no mel por tolerar condições ácidas e níveis altos de sacarose, enquanto que as leveduras osmofílicas crescem quando a pressão osmótica é alta. Estas podem crescer até mesmo no mel maduro, fermentando-o facilmente (SNOWDON, 1999). A fermentação do mel resulta no crescimento da levedura convertendo o açúcar em álcool, gás carbônico, ácidos orgânicos e outras combinações com sabores e odores indesejáveis (SNOWDON,1999). As leveduras encontradas no mel com predominância são: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula* (MIGDAL et al., 2000).

### 6.2.2. Sólidos solúveis totais

As amostras de mel analisadas apresentaram um valor médio de 79,73 %, com valores entre 79,6 e 80%. No mel, esse resultado representa, com bastante exatidão, a quantidade, em percentual, de açúcares totais (SILVA et al, 2003). A legislação atual não exige a análise de grau Brix para determinação da qualidade do mel, porém essa medida foi realizada para compor mais uma variável de comparação dos resultados.

Semelhantemente, estudos realizados por Silva et al (2004), encontraram valores de °Brix que variaram entre 76,07 a 80,80 °Bx, analisando méis de *Apis mellifera*, originários do estado do Piauí. O valor médio encontrado por Silva et al (2009), foi de 83,28 °Bx. Em análise de 15 amostras provenientes de diferentes cidades do estado de Goiás, a média encontrada foi de 81,04 °Bx, sendo o maior e o menor resultado encontrado de 85 e 78,3 °Bx, respectivamente (SILVA et al, 2003). Carvalho et al. (1998) e Marchini & Moreti (2001), ao realizarem análises relataram valores de 76,0 à 80,1%, tendo desta maneira, resultados similares ao do presente trabalho.



## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os parâmetros das legislações vigentes, destaca-se que a presente análise detectou a presença mais significativa, do ponto de vista microbiológico, por parte dos fungos filamentosos e leveduras, das bactérias mesófilas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus coagulase-positivos*, apesar dos isolamentos positivos das amostras de mel apresentarem-se de acordo com os padrões estabelecidos pela portaria n° 367/97 (Brasil, 1997A), portaria n° 451/97 (Brasil, 1997) e RDC n o 12/2001. A quantidade reduzida da detecção de fungos filamentosos, leveduras e bactérias mesófilas, que representam os principais marcadores higiênicos de qualidade em alimentos, pôde estar associado a presença de fatores antimicrobianos do mel, de adoção de boas práticas de higiene durante à manipulação, ao cuidado no processo de armazenamento e da localização das áreas de criação das colmeias afastadas de fontes poluidoras.

As análises físico-químicas de sólidos solúveis totais e umidade das seis amostras de mel estão dentro dos limites preconizados. E em apenas duas amostras apresentaram valores de acidez superiores ao limite estabelecido pelas legislações vigentes (BRASIL, 2000), podendo ter sido influenciada pela origem botânica da florada, por condições climáticas e geográficas ou pela colheita do mel antes da sua completa maturidade e pela presença de leveduras osmofílicas que podem também aumentar o risco para a ocorrência de fermentação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E. M. 2008. Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das Ilhas Floresta e Laranjeira, do Alto Rio Paraná. 63 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PA.

ABEMEL (Associação Brasileira dos Exportadores de Mel). Dados das exportações de mel. Setor apícola brasileiro em números. 2016a. Disponível em: <http://brazilletsbee.com.br/dadossetoriais.aspx>. Acessado em: 04 de fev. 2021.

ABEMEL (Associação Brasileira dos Exportadores de Mel). Apicultura no Brasil. Disponível em: <<http://brazilletsbee.com.br/o-setor.aspx>>. Acesso em: 04 de fev. 2021.

BASTOS, E. M. Espectro polínico do mel produzido em algumas áreas antrópicas de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.789-799, 1995.

AZEREDO, L. C.; AZEREDO, M. A. A.; DUTRA, V. M. L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, n.80, p.249-254, 2003.

AL, L. M. et al. Physico-chemical and bioactive properties of diferente floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, v.112, p.863-867, 2009.

AGATA, N.; OHTA, M.; YOKOYAMA, K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereude) in various foods. *International Journal at Food Microbiology*, v.73, p. 23-27, 2002.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, 4<sup>a</sup> ed., 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, 4<sup>a</sup> ed., 2001.

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

BAM. Bacteriological Analytical Manual. *Bacillus cereus*. In: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins (The Bad Bug Book). Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 2002a.

BASTOS, E. M. Espectro polínico do mel produzido em algumas áreas antrópicas de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.789-799, 1995.

BEHM, I. C. Levantamento do nível tecnológico dos apicultores familiares ligados a Associação Duovizinhense, Dois Vizinhos, PR. Anais. 2012.

BEKERS, M. et al. New prebiotics for functional food. *Acta-Alimentaria*, v.33, n.1, p.31-37, 2004.

BENNETT, R. W.; MONDAY, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: International Handbook of Foodborne Pathogens. MILIOTIS, M. D.; BIER, J. W. Marcel Dekker Inc. New York, p.53- 71, 2003.

BERTOLDI, F.C.; GONZAGA, L.; Reis, V.D.A. Características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), com florada predominante de hortelã-do-campo (*Hyptis crenata*), produzido no Pantanal. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do pantanal, 4., 2004, Anais. Corumbá - MS. p.1-4, 2004.

BRANDÃO, A. L. S.; BOARETTO, M. A. C. (Ed.). Apicultura atual: diversificação de produtos. Vitória da Conquista/BA: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 150p. 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial, Brasília, 23 out. 2000, Seção 1, p. 23.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do Botulismo. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. 86p.

BRASIL. Portaria Ibama N° 117, de 15 de outubro de 1997a. Dispõe sobre a comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna silvestre. Diário Oficial da União, Brasília, DF, Seção I, 16 de outubro 1997. p. 23.489/490. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/fauna/faunasilvestre/1997\\_ibama\\_portaria\\_117-1997\\_comercio-de-fauna-silvestre-nativa.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/fauna/faunasilvestre/1997_ibama_portaria_117-1997_comercio-de-fauna-silvestre-nativa.pdf)>. Acesso em: 04 de fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância Epidemiológica do Botulismo. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2006. 86p.

BRASIL. Portaria nº 367, de 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de mel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19696.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução – RDC N° 216, de 15 de Setembro de 2004. Estabelece procedimentos de boas Práticas para serviço de alimentação, garantindo as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 setembro de 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA, 2018.

BRASIL, Governo do estado do Rio de Janeiro. "Consumo e venda de mel aumentam durante a pandemia. Abelhas adoçando a quarentena." Notícia online. Rio de Janeiro, 2021. Disponível em [:http://www.rj.gov.br/secretaria/NoticiaDetalhe.aspx?id\\_noticia=6273&pl=consumo-e-venda-de-mel-](http://www.rj.gov.br/secretaria/NoticiaDetalhe.aspx?id_noticia=6273&pl=consumo-e-venda-de-mel-)

[aumentam-durante-a-pandemia.-abelhas-ado%C3%A7ando-a-quarentena#:~:text=%E2%80%9CO%20setor%20movimentou%20mais%20de,mel%20produzido%20por%20914%20apicultores>>Acesso](#) em: fev.2021.

CBA (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTURA). Brasil apícola. Disponível em: <<http://brasilapicola.com.br/sobre-a-cba/>> Acesso em: 04 de fev. 2021.

CAMARGO, R. C. R. Boas Práticas de Manipulação na colheita de mel. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Comunicado Técnico. Teresina, PI, 2002.

CAMARGO, R. C. R. de. (Ed.). Sistema de produção de mel. Teresina: Embrapa Meio Norte, 2016. (Sistema de Produção, 3). Disponível em: < [www.spo.cnptia.embrapa.br/temaspublicados](http://www.spo.cnptia.embrapa.br/temaspublicados) >. Acesso em: 04 de fev. 2021.

CANO, C. B. et al. Mel: Fraudes e condições sanitárias. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v 52, p.1-4, 1992.

CARVALHO, C. A. L. et al. Características físico-químicas de amostras de méis da Bahia. In: Congresso Brasileiro de Apicultura, 12, 1998, Salvador. Resumos. Salvador: FAABA, 1998. p.200.

CARDOSO, T. et al. Botulismo alimentar: estudo retrospectivo de cinco casos. *ACTA Médica Portuguesa*, Lisboa, v.17, p.54–58, 2004.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* sp. Revista do Instituto de Ciências da Saúde. v.24, n.2, p. 95–101, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. Revised codex standard for honey. Rev. 2 [2001]. 24th session of the Codex Alimentarius in 2001. Disponível em: [http/ www.codexalimentarius. net/standard](http://www.codexalimentarius.net/standard). Acesso: 04 de fev. 2021.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução Nº 496, Art. 1º Resolução disciplina o uso e o manejo sustentáveis das abelhas-nativas-sem-ferrão em meliponicultura. Diário Oficial da União, 19 de Agosto-2020.

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, 1983. 225p.

CRANE, E. O Livro do mel. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 230 p.

CRANE, E. Bees and beekeeping-science, practice and world resources. London: Neinemann Newnes, 1990. 614p

CRANE, E. Honey: a comprehensive survey, 1979. Apud: SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey, Review article, *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p.1-26, 1996.

CHRISTIANSSON A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal of Dairy Science*. v.82, p.305-314, 1999.

DEVILLERS, J. et al. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, v.86, p. 305- 312, 2004.

DELMAS, C.; VIDON, D.J.M.; SEBALD, M. Survey of Honey for *Clostridium botulinum* Spores in Eastern France. *Food Microbiology*, v.11, n.6, p. 515-518, 1994.

DOYLE, M. P. Fecal coliforms in tea: what's problem? *Food Technology*, Back page, 1996.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Terezina-PI Apicultura: Sistema de Produção ,3. ISSN: 1678-8818. Versão Eletrônica, 2003.

ETTINGER, S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia, São Paulo, cap.3, p 30-64, 2002.

EVANGELISTA, JOSÉ. Tecnologia de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química dos mel de abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

FAO. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. 2013. Bridging the gap- FAO's programme for gender equality in agriculture and rural development. Disponível em: < <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1243e/i1243e00.pdf> >. Acessado em: 20 de dezembro de 2020.

FIOCRUZ, Ministério da Saúde. Portaria da Presidência nº 420/08-PR, de 25/11/2008 – Regulamenta os Serviços de Referência de Diagnóstico Laboratorial da Fiocruz e a execução de atividades para a Área de Vigilância Epidemiológica, na Condição de Referência Nacional e Regional em função da portaria 649/07 do Fundo Nacional de Saúde.

FINLAY, W. J. J.; LOGAN, N. A.; SUTHERLAND, A. D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology*.v.19, p.423-430, 2002.

FRANCO, B. D. G. M. Critérios microbiológicos para avaliação da qualidade de alimentos. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu. cap.8, p.149-154. 2008

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p

FREAN, J. et al. Fatal type A botulism in South Africa, 2002. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.98, p.290-295, 2004.

FREITAS, D. G. F.; KHAN, A. S.; SILVA, L. M. R.. Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, v.42, n.1, p. 171-188, 2004.

*FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION* – FAO. Data - Production. Disponível em: [faostat.fao.org](http://faostat.fao.org). Acesso em: 20 fev. 2021

GELLI, D.S. et al. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v.44, n.6, p.321-324, 2002.

GROSSO, G. S.; ROJAS, C. A. H.; MORENO, G. I.; LINA, A. Características microbiológicas de las mieles tropicales de *Apis mellifera*. *Apicultura*. p.1-7. dez. 2002.

GOERZEN, D. W. Microflora associated with the alfalfa leafcutting bee, *Egachile rotundata* (Fab) (Hymenoptera: Megachilidae) in Saskatchewan, Canada. *Apidologie*, v.22, p.553-561, 1991.

HART, C. A.; WINSTANLEY, C. What makes a pathogen? *Microbiology Today*, v.28, p. 4-6, 2001.

HORIE, M. et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.27, n.5, p.863-874, 2004.

HORN, H. Alunos da disciplina análise de mel da Universidade de Hoheinheim, Alemanha. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., 1996, Teresina, PI. Anais. Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p.403-429.



IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa pecuária municipal. IBGE (2017). Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/74>>. Acesso em: 04 de fev. 2021.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados agregados. SIDRA (Sistema Ibge de recuperação automática). 2014. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=969&z=p&o=2&i=P>. Acesso em 04 de fev. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed, São Paulo: Ed. Adolfo Lutz, 2005.

ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. 6888-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). 1999.

ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds – Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95. 2008.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 6579-2002: detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage. Geneva, 2002. 9p. Amd 1:2007, annex D.

JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. cap.24, p. 491-515.

JACQUETTE, C. B.; BEUCHAT, L. R. Combined effects of pH, nisin and temperature on growth and survival of psychrotrophic *Bacillus cereus*, 1998. Apud: IURLINA, M. O.; SAIZ, A. I.; FUSELLI, S. R.; FRITZ, R. Prevalence of *Bacillus* spp in different food products colleted in Argentina, LWT, v.39, p.105-110, 2006.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.58, p.47-51, 1999.

KEET, C. A.; STROBER, J. B. Recent advances in infant botulism. *Pediatric Neuroscience*, Basel, v.32, p.149-154, 2005.

KONEMAN, E. W.; WINN JÚNIOR, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p

KRAMER, R. G. O mel. Mensagem Doce, n.42, jul.1997. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/42/artigo.htm> / acessado em: 04 de fev. 2021.

KÜPLÜLÜ, Ö. et al. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*, v.17, p. 222-224, 2006.

LEAL, V. M.; SILVA, M. H.; JESUS, N. M. Aspecto físico-químico do mel de abelhas comercializado no município de Salvador-Bahia. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2001. Disponível em: <<http://www3.rbspa.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewFile/585/301>>. Acesso em: 06 dez.2020.

LIRA, G. M.; PEREIRA, W. D.; ATHAYDE, A. H.; PINTO, K. P. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - Al. *Revista Higiene Alimentar*, v. 15, n. 84, p. 67-74, maio 2001.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C.; OTSUK, I. P. Análise de Agrupamento, com Base na Composição Físico-química, de Amostras de Méis Produzidos por *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p. 8-17, 2005.

MARCHINI, L. C. Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera-Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Livre Docência, Piracicaba – SP, 2001, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. M. A.. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, n.98, n.546, p. 85-88, 2003.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. Características físico-químicas de amostras de mel de cinco diferentes espécies de eucaliptos. In: Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 4, Campinas, 2001. Resumos. Campinas: SBCTA, 2001. p.42.

MATSUNO, T. O efeito terapêutico da própolis. [S.l.]: [s.n.], 1997. v. 1.

MELO, Z. F. N. Características físico-química de méis de abelha (*Apis mellifera* L.) em diferentes condições de armazenamento. 2002. 71 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

MEIRELES, S.; CANÇADO, I. A. C. Mel: parâmetros de qualidade e suas implicações para a saúde. *SynThesis Revista Digital FAPAM*, Pará de Minas-MG, v. 4, n. 4, 207-219, 2013.

MIGDAL, W. et al. Microbiological decontamination of natural honey by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, v.57, n.3-6, p.285-288, 2000.

MONETTO, A.M. et al. A study of botulinum spores in honey. *Anaerobe*, Los Angeles, v.5, p.185-186, 1999.

MOTHERSHAW, A. S.; JAFFER, T. Antimicrobial activity of foods with different physico-chemical characteristics. *International Journal of Food Properties*, v.7, n.3, p.629-638, 2004.

NATARO J. P.; KAPER, J. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p. 142-201, 1998.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 1ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2004. 42 p.

NERIS, M. S.; LACERDA, L. M.; RABÊL, H. P. S. M.; LIMA, L. M. Ocorrência de bolores e leveduras em méis comercializados informalmente no estado do Maranhão. *Nutrire*, v.38, n.Suplemento, p.439-439, 2013.

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

NORONHA, P. R. G. Caracterização de méis cearenses produzidos por abelhas africanizadas: parâmetros químicos, composição botânica e calorimetria. 146f. 1997. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceara, UFC. Fortaleza, CE.

OSÓRIO NETO, N.C.; ROCHA, I.M.O. I Pesquisa Apícola Fluminense - Cooperativa Apícola do Rio de Janeiro Ltda. 1 ed. Rio de Janeiro:Niterói, 1994. 25p.

PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; CAMARGO, R. C. R.; VILELA, S. L. O. 2003. Produção de mel. Embrapa Meio Norte, sistemas de produção, 3, Versão eletrônica, jul 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/Fontes/Mel/index.htm.2002>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

PACHECO, M. R. Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera Linnaeus* no Estado do Rio de Janeiro: perdas, zoneamento, palinologia e microbiologia. Dissertação (Mestrado), Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

PERUCA, R. D.; BRAIS, C. V.; OLIVEIRA, A. P.; MUSSOLINE, V.; ALVES, J. A.; HORITA, S. F. Projeto de fortalecimento da apicultura dos agricultores familiares no estado de Mato Grosso do Sul. 13 p. 2002.

PEREIRA, F. M.; CAMARGO, R. C. R.; LOPES, M. T. R. Contaminação do mel por presença de *Clostridium botulinum*. Teresina: Embrapa Meia-Norte, p.17; 2007.

PEREIRA, A. P. R. Caracterização de mel com vista a produção de hidromel. 2008. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária de Bragança, Bragança, 2008.

PIRES, R. M. C. Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí. Dissertação de Mestrado em Alimentos e Nutrição, UFPI, Teresina-PI, 2011.

POLAQUINI, L. E. M. et al. Estudo de toxina botulínica e esporos de *Clostridium botulinum* em amostras de cama de frangos, coletadas em aviários. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 34., 1997, Juiz de Fora, MG. Anais Juiz de Fora: SBZ, 1997. p.48.

RALL, V. L. M. et al. Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health? *Anaerobe*, v.9, p.299-303, 2003.

RALL, V. L. M. et al. Incidência de esporos de *Clostridium botulinum* e análise da qualidade microbiológica do mel no estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu, PR. Anais... Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.403.

REGINATTO, A.; OLIVEIRA, T. C. Inspeção da Qualidade do Mel de Guarapuava e Região Utilizando Análises Físico-Químicas e Microbiológicas. Guarapuava. 2004.

REIBNITZ, M. G. R.; TAVARES, L. B. B.; GARCÍA, J. A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAsa positivos en queso. *Revista Argentina de Microbiología*, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

RHODEHAMEL, E.J.; HARMON, S.M. *Bacillus cereus*. In: Bacteriological Analytical Manual, 8ª ed., Cap.14, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-14.html> / Acessado em: 06/11/2020).

RIBEIRO, R. O. R. Elementos traço em méis de abelha (*Apis mellifera*) do estado do Rio de Janeiro, Brasil: influências da sazonalidade. 107. Dissertação de Mestrado (Medicina veterinária). Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2010.

RÍOS DE SELGRAD, A. M.; MIZRACHI, R.; NOVOA, M. L.; VIT OLIVIER, P. Incidencia y tipos de hongos (mohos y levaduras) y levaduras osmotolerantes en mieles vnezoelanas. *Revista Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, v.23, p. 16-22, 1992.

RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F. RODRIGUES, M. L. Análise Físico-Química de Méis das Abelhas *Apis Mellifera e Melipona Scutellaris*. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/agrociencia/artigo/50>>. Acesso em: 27 de outubro de 2020.

ROOT, A. I. The ABC and XYZ of Bee Culture, 1983. Apud: SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Microorganisms in honey, Review article, *International Journal of Food Microbiology*, v.31, p.1-26, 1996.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.2, p.171-175, abr./jun. 2006.

SANT'ANA, A. S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 23, supl., p.190-194, 2003.

SANTOS, B. M. O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. *Revista Latino Americana de enfermagem*, v.8, n.1, p. 67-73, 2000.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no estado do Piauí para as diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.8, n.2/3, p. 260-265, 2004.

SILVA, R. N. et al. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 23, n. 3, p. 337-341, set./dez. 2003.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SILVA, B. P. P. C. Caracterização Físico-química de mel produzido em Santo Antônio do Tauá in. 14º Encontro de profissionais da química do Amazonas, p. 39 a 43, Universidade Federal Rural da Amazônia, 2016.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos* v.26, n.2, p.352-9, 2006.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. São Carlos- São Paulo/Brasil. *Revista APS*, v.9, n.1, p. 83-88, jan./jun. 2006

SCHLABITZ, C.; SILVA, S. A. F.; SOUZA, C. F. V. Avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos em mel. *Revista brasileira de tecnologia agroindustrial*. n.4, p.80-90, 2010.

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

SNOWDON, J. A.; CLIVER, D. O. Micro-organisms in honey. *International Journal of Food Microbiology*, v.31, n.1-3, p.1-26, aug.1996.

SNOWDON, J. A. The microbiology of honey - meeting your buyers specifications (Why they do what they do). *American Bee Journal*, Hamilton, v.139, n.1, p.51-59, 1999.

SOLOMON, H. M.; LILL, Y. T. *Clostridium botulinum*. In: Bacteriological Analytical Manual, 8<sup>a</sup> ed., Cap. 17, 2001. (Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html> / Acessado em: 06/11/2020).

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P., et al. Study of presence of the *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.24, p.379-382, 1999.

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. et al. Caracterização Físico-química de Amostras de Méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. *Revista Ciência Rural*, v.37, p.1139-1144, 2007.

SOUZA, F. G.; RODRIGUES F. M.; RODRIGUES, L. G. S. M. Análise do mel de pequenos produtores do vale do Médio Araguaia-Tocantins. *Enciclopédia Biosfera*. Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p.1001, nov. 2012



TESSARI E. N. C, CARDOSO A. L. S. P, CASTRO A. G. M. Prevalência de *Salmonella* Enteritidis em carcaças de frango industrialmente processadas. *Higiene Alimentar*. v.17, n.107, p.52-55, 2003.

VENTURINI, K. S. SARCINELLI, M. F. SILVA, L. C. Características do Mel; Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em: <http://www.vidaperpetua.com.br>>. Acessado em 18 de dez. 2020.

VISQUERT, M. et al. Changes in the quality parameters of honey caused by thermal processes. *Alimentacion-Equipos-y-Tecnologia*. v.23, n.188, p.87-92, 2004.

VARGAS, T. **Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

WAILI-AL, N. S. Natural honey lowers plasma glucose, C-reactive protein, homocysteine, and blood lipids in health, diabetic, and hypelipidemic subjects: comparison with dextrose and sucrose. *Journal of Medicinal Food*. v.7, n.1, p.100-107, 2004.

WANDERLEY, R. O. S; WANDERLEY, P. A.; DANTAS, M. B; MACHADO, A. V.; MARACAJÁ, P. B.; Avaliação dos parâmetros de qualidade e estabilidade térmica de méis produzidos na região de Sousa-PB. *ACTA Apicola Brasilica* - ISSN 2358-2375 - (Pombal - PB) v. 03, n.1, p.10 - 16, jan-dez, 2015

WIESE, H. Novo Manual de Apicultura. Guaíba-RS:Editora Agropecuária LTDA. 292p. 1995.

WIESE, H. *Nova apicultura*. Guaíba-RS: Agropecuária, 1993. 493p.

WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. London: Heinemann, 1975. p.207-239.

WHITE, J. W. JR. Honey. *Advances Food Research*, v. 24, p.287-374, 1978.

WOLFF, L. F. Apicultura sustentável na propriedade familiar de base ecológica. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 15 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular técnica, 64.).

ZAPPALA, M. et al. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. *Food Control*. v.16, n. 3, p. 273-277, 2005.

ZOCCAL, R. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2015.

## ANEXO I

Tabela da relação entre o índice de refração e a porcentagem de água dos méis.

Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %	Índice de refração a 20°C	Umidade %
1,5044	13,0	1,4961	16,2	1,4880	19,4	1,4800	22,6
1,5038	13,2	1,4956	16,4	1,4875	19,6	1,4795	22,8
1,5033	13,4	1,4951	16,6	1,4870	19,8	1,4790	23,0
1,5028	13,6	1,4946	16,8	1,4865	20,0	1,4785	23,2
1,5023	13,8	1,4940	17,0	1,4860	20,2	1,4780	23,4
1,5018	14,0	1,4935	17,2	1,4855	20,4	1,4775	23,6
1,5012	14,2	1,4930	17,4	1,4850	20,6	1,4770	23,8
1,5007	14,4	1,4925	17,6	1,4845	20,8	1,4765	24,0
1,5002	14,6	1,4920	17,8	1,4840	21,0	1,4760	24,2
1,4997	14,8	1,4915	18,0	1,4835	21,2	1,4755	24,4
1,4992	15,0	1,4910	18,2	1,4830	21,4	1,4750	24,6
1,4987	15,2	1,4905	18,4	1,4825	21,6	1,4745	24,8
1,4982	15,4	1,4900	18,6	1,4820	21,8	1,4740	25,0
1,4976	15,6	1,4895	18,8	1,4815	22,0	-	-
1,4971	15,8	1,4890	19,0	1,4810	22,2	-	-
1,4966	16,0	1,4885	19,2	1,4805	22,4	-	-

Nota: na correção do índice de refração para temperatura diferente de 20°C: Adicionar 0,00023 ao índice de refração para cada grau acima de 20°C, antes de usar a Tabela 1. Subtrair 0,00023 do índice de refração para cada grau abaixo de 20°C, antes de usar a Tabela 1.