

---

# Avaliação físico-química da qualidade do mel proveniente da agricultura familiares do distrito de Canta Galo-Rio das Ostras-RJ

- | Ingrid Annes Pereira
- | Larissa Aguiar de Moraes
- | Mariana Pontes
- | Regina Marias Finger
- | Flávia Beatriz Custódio
- | Francisco Martins Teixeira

# 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 ou fraudes. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar o diagnóstico da qualidade físico-química e microbiológica de amostras de mel produzido em unidades familiares localizadas em áreas assentamento agrário no distrito de Cantagalo, Rio das Ostras-RJ. 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 avaliadas 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.

**Palavras-chave:** Mel, Qualidade, Marcadores Higienicossanitários e Produção Familiar.

## ■ INTRODUÇÃO

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 (BEHM *et al.*, 2012).

No Brasil, a importância da apicultura é consolidada pela multiplicidade de reservas florais, permitindo que toneladas de méis sejam produzidas atendendo assim os mercados mais exigentes (WIESE, 1993). Nosso país está colocado no *ranking* mundial entre os maiores produtores de mel, sendo a China o primeiro lugar, em seguida da Turquia e Argentina (FAO, 2018). A apicultura é uma produção agrícola considerada livre dos grandes problemas de sanidade, como resíduos de medicamentos e pesticidas (PACHECO, 2006). Entretanto, ainda existe um grande potencial (flora e clima) não explorado, e 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).

Neste contexto, a apicultura 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). 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). 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.

O local de coleta de amostras de mel do presente estudo foi o distrito de Cantagalo no município de Rio das Ostras (RJ), que é constituído majoritariamente pelo projeto de assentamento Cantagalo, instituído pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA), em 1987. Entre as diversas propriedades do distrito de Cantagalo, há 10 pontos de coleta de mel, cada um contendo em média 14 colmeias, onde foram obtidas as amostras de mel. O distrito é abastecido pelo rio Jundiá, que nasce entre a Serra do Pote e a Serra da Careta percorre as várzeas até encontrar o rio Iriry, no encontro destes dois rios é formado o rio das Ostras, que dá nome à cidade. O clima característico é o tropical úmido, com inverno seco e verão úmido e temperaturas típicas de região litorânea, variando de 15 a 38 °C, sendo que as máximas ocorrem entre os meses de novembro e fevereiro e as mínimas entre os meses de junho e setembro. Vale destacar que está inserido no bioma Mata Atlântica, possuindo uma grande diversidade de ecossistemas com destaque para o Corredor da Serra do Mar, abrangendo um dos maiores remanescentes florestais da Floresta Ombrófila Densa (ICMBIO, 2020).

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). 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 carbonocarboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias





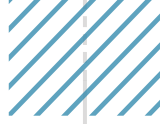
aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração (MAPA, 2000; CODEX, 2001). É considerado um alimento de alto valor energético para o organismo humano (CRANE, 1987) uma vez que, 1 grama de mel contém 6,4 kcal (ETTINGER, 2002) (Tabela 01).

O mel é um produto complexo, cuja composição varia notadamente em consequência da flora 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 (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, imunoesestimulante e cicatrizante (BEKERS *et al.*, 2004; WAILI-AL, 2004; AL *et al.*, 2009).

O mel tem sido amplamente explorado pela sua riqueza nutritiva e sua composição, que inclui micronutrientes como vitaminas, 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; AZEREDO; 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.

Como produto de origem natural o mel de abelha africana (*Apis mellifera*), apresenta uma microbiota 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).



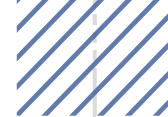


Embora o mel seja um produto que por suas características físico-químicas não apresente alta susceptibilidade à proliferação de microrganismos, a ação de fatores externos (ambientais, condições de manipulação e estocagem) pode influenciar negativamente sua qualidade final (CAMARGO, 2002). Segundo a Portaria 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. Outro fator pouco considerado é o período do ciclo produtivo. A época da estação de floração 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



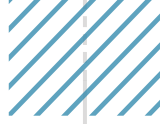


de sacarose (SNOWDON; CLIVER, 1996), sendo assim, consideradas um problema na indústria de mel. Segundo Crane (1979), o aumento da umidade e temperatura na estocagem do mel favorecem o desenvolvimento de leveduras, contribuindo para a fermentação do produto. Durante a fermentação, as leveduras atacam 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. 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 a 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 (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). 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). 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. 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 (KÜPLÜLÜ *et al.*, 2006).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são patógenos reconhecidos em Doenças de transmissão alimentar a partir da contaminação de origem humana e animal. São bactérias em formato de 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. O homem é o principal reservatório de *S. aureus* e os percentuais de colonização variam de 60 a 70% (SANTOS, 2000).

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. *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 (SILVA; CAVALLI, OLIVEIRA, 2006).





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 período de tempo maior (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. 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 diarreiogênicas 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).

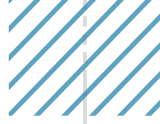
A segurança alimentar é uma questão com importância crescente em saúde pública, e os governos de todo o mundo têm intensificado seus esforços visando melhorias (WHO, 2007). Portanto, é necessária a prevenção dessas doenças veiculadas por alimentos, através de instituição de medidas preventivas eficazes 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).

## ■ MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostragem

Neste estudo avaliou-se um total de seis amostras de mel obtido durante o período de outubro 2019 proveniente da agricultura familiar do distrito de Cantagalo- Rio das





Ostras localizadas em áreas de assentamento agrícola com remanescentes da Mata Atlântica. As amostras foram obtidas em frascos de 250 mL ou em garrafas de vidro de um litro. As amostras foram enviadas para o laboratório de Microbiologia de alimentos do Polo Ajuda UFRJ Campus Macaé para as análises microbiológicas acondicionadas em temperatura ambiente. O processamento das amostras de mel foi realizado 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).

### **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..

- 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).

- 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.

#### – 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 /mL (ISO 21527-1, 2008).

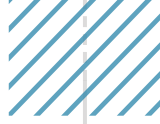
#### – Contagem e Identificação de *Staphylococcus* spp.

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).

#### – 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 2), em superfície de placas de Petri descartáveis estéreis contendo meio seletivo para *Bacillus cereus* (MYP / microMed). As placas foram incubadas a 30 °C por 24-48 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 (Merk®) inclinado e incubado a 30 °C por 24 horas, posteriormente foram realizados testes para identificação (APHA, 2001; KONEMAN *et al.*, 2008).

– 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) e em Agar Sulfito Polimixina-Sulfadiazina (SPS - Vetec) acrescido de 5% de emulsão de gema de ovo sendo incubadas 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 (KÜPLÜLÜ *et al.*, 2006; SOLOMON; LILLY, 2001).

– 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 Tetrationato 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..

## ■ ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA QUALIDADE DO MEL:

– 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. 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.

– 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 totais têm correspondência direta com todas as substâncias que se encontram dissolvidas em um determinado solvente. São expressos em °Brix e tem tendência de aumento com a maturação.



## – 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 destilada. Em seguida, foi adicionado de 2 a 4 gotas de fenolftaleína e feita a titulação com solução de hidróxido de sódio, com a concentração de 0,1062 mol/l, até atingir a coloração rósea. Anota-se o volume gasto e faz-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.

## ■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

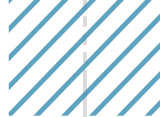
### Análises microbiológicas

Foi analisado um total de seis amostras de dois lotes de mel distintos, e para todas estas amostras 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 01 apresenta os resultados das análises microbiológicas para avaliação do perfil higienicossanitário do mel em questão e as discussões serão apresentadas a diante (Tabela 02)

## – Contagem total de bactérias heterotróficas mesófilas aeróbias estritas e facultativas

Resultados obtidos nas contagens de bactérias mesófilas foram menores ou iguais a 10<sup>1</sup> UFC/g 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 Schlabitz *et al.* (2010), quando avaliavam a qualidade microbiológica do mel comercializado na região do Vale do Taquari/RS, onde obtiveram resultados variando de 1x10<sup>1</sup> à 2,7 x 10<sup>2</sup> 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 permite 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; SILVA, 2002).

#### – 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 detectada 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. 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.

#### – 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. 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.

#### – 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. Schocken-Iturrino *et al.* (1999) analisaram 80 amostras de mel brasileiro das quais, seis (7,50%) estavam contaminadas com *C. botulinum*.

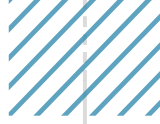
#### – Contagem de fungos filamentosos e leveduras

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 11/2000 onde consta em anexo o RTIQ 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. Sodr e *et al.* (2007) detectaram a contagem de  $1,7 \times 10^4$  e Schlabit z *et al.* (2010) que avaliando a qualidade microbiológica dos m eis de *Apis mellifera* relataram o valor de  $2,7 \times 10^2$  UFC/g. A presença de fungos filamentosos no produto final pode estar relacionada   sua capacidade em suportar concentra es elevadas de a u ar, 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 condi es de baixo pH e não são inibidas pela sacarose. A presença de leveduras osmofílicas no mel   um problema, pois o seu crescimento apenas está limitado pela quantidade de água disponível. Algumas condi es, tais como, o aumento da umidade, temperatura moderada, granula o, e contagem elevada de leveduras favorecem a fermenta o do mel.

#### – Pesquisa de *Salmonella* spp.

Em todas as seis amostras obtiveram-se como resultado, ausência de *Salmonella* spp.. estando em conformidade com a legisla o 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. A qualidade microbiológica de determinado alimento incluindo mel está relacionada diretamente com as condi es higi nicas de produ o e manipula o das amostras e a forma de armazenamento, envolvendo, portanto, um contexto mais social do que botânico e, por se tratar de um microrganismo patog nico, requer aten o e remete  





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.

#### – 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. 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.

## ■ 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.

#### – 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 03). 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, 2000). 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. 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.

#### – Acidez

Os valores da acidez para as seis amostras de mel analisadas variaram entre 27,35 a 82,19 meq.kg<sup>-1</sup>, com média de 51,83 meq.kg<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup> 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. 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. 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. As leveduras encontradas no mel com predominância são: *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula* (SNOWDON, 1999).

#### – 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. 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. 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.

## ■ 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 apresentam-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 micrororganismos marcadores sanitários pode 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 amostras de mel foram obtidas em uma unidade apícola familiar localizadas próximas às nascentes dos rios Jundiá e Iriri, assentados da reforma agrária, em áreas de remanescentes da mata Atlântica no distrito de Cantagalo, Rio das Ostras-RJ, preservadas da ação antrópica, desmatamento, urbanização e a especulação imobiliária.

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.

## ■ AGRADECIMENTO

Ao CNPq pela cessão de bolsa no programa PIBIC/IC/UFRJ.



## ■ REFERÊNCIAS

1. 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.
2. BEKERS, M. et al. New prebiotics for functional food. *Acta-Alimentaria*, v.33, n.1, p.31-37, 2004.
3. CRANE, E. O Livro do mel. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1987. 230 p.
4. BEHM, I. C. Levantamento do nível tecnológico dos apicultores familiares ligados a Associação Duovizinhense, Dois Vizinhos, PR. Anais. 2012.
5. CANO, C. B. et al. Mel: Fraudes e condições sanitárias. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v 52, p.1-4, 1992.
6. DEVILLERS, J. et al. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chemistry*, v.86, p. 305- 312, 2004.
7. CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, 1983. 225p.
8. 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.
9. WIESE, H. *Nova apicultura*. Guaíba-RS: Agropecuária, 1993. 493p
10. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO*. Data - Production. Disponível em: faostat.fao.org. Acesso em: 20 fev. 2021
11. *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO*. Data - Production. Disponível em: faostat.fao.org. Acesso em: 20 fev. 2021
12. ETTINGER, S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: Krause - Alimentos, nutrição e dietoterapia, São Paulo, cap.3, p 30-64, 2002.
13. 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.
14. ICMBio – disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/portal/rebio-uniao>
15. 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.
16. 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.
17. EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Terezina-PI Apicultura: Sistema de Produção ,3. ISSN: 1678-8818. Versão Eletrônica, 2003.
18. ZOCCAL, R. A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 2015.

19. 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.
20. 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.
21. CAMARGO, R. C. R. Boas Práticas de Manipulação na colheita de mel. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - Comunicado Técnico. Teresina, PI, 2002.
22. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA) - Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, 4<sup>a</sup> ed., 2001.
23. 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.
24. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4<sup>a</sup> ed, São Paulo: Ed. Adolfo Lutz, 2005.
25. 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.
26. 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.
27. WHITE, J. W. JR. Honey. *Advances Food Research*, v. 24, p.287-374, 1978
28. 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.
29. 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. SANT'ANA, A. S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 23, supl., p.190-194, 2003.
30. 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.
31. KÜPLÜLÜ, Ö. et al. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. *Food Control*, v.17, p. 222-224, 2006.
32. 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: . Acesso em: 06 dez.2020.
33. 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



34. 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.
35. 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.
36. 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).
37. 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.
38. 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
39. NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão*. São Paulo: Nogueirapis. 1997. 446 p
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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
45. FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005. 182 p
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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



50. 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.
51. 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
52. 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
53. JAY, J. M. Microbiologia de Alimentos. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. cap.24, p. 491-515.
54. NATARO J. P.; KAPER, J. Diarrheagenic Escherichia coli. Clinical Microbiology Reviews, v.11, p. 142-201, 1998.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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
62. 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.