



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

**PRODUTOS MELIPONÍCOLAS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) DO
SEMIÁRIDO POTIGUAR**

MOSSORÓ

2021

KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

**PRODUTOS MELIPONÍCOLAS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) DO
SEMIÁRIDO POTIGUAR**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como requisito
para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção
Animal

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva

MOSSORÓ

2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

L979p Luz, Kewen Santiago da Silva.
PRODUTOS MELIPONÍCOLAS DE ABELHA JANDAÍRA
(Melipona subnitida) DO SEMIÁRIDO POTIGUAR /
Kewen Santiago da Silva Luz. - 2021.
137 f. : il.

Orientador: Jean Berg Alves da Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2021.

1. Meliponini. 2. Propriedade intelectual. 3.
Bioativos naturais. 4. Processos fermentativos.
I. Silva, Jean Berg Alves da, orient. II. Título.

KEWEN SANTIAGO DA SILVA LUZ

PRODUTOS MELIPONÍCOLAS DE ABELHA JANDAÍRA (*Melipona subnitida*) DO SEMIÁRIDO POTIGUAR

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade e Produção Animal

Defendida em: 30 / 03 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

JEAN BERG ALVES
DA
SILVA:02556429461
Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Presidente

Assinado de forma digital por JEAN BERG ALVES DA SILVA:02556429461
Dados: 2021.04.05 15:11:00 -03'00'


Prof.^a Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra (UFERSA)
Membro Examinador


Prof.^a Dra. Maria Rociene Abrantes (UFERSA)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Inês Luz e Maridelson Luz por todo carinho e ensinamentos. Por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, acreditarem no meu potencial e por serem meus exemplos de vida.

Agradeço a Rociene Abrantes pela grande amizade, pelos conselhos, por acreditar no meu potencial e me apoiar nas minhas decisões, ideias e escolhas. Também agradeço o auxílio imprescindível na execução dessa pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Jean Berg, pelo acolhimento, pela paciência, pela positividade nos momentos em que nada dava certo e pelo exemplo como profissional.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Semi-Árido pelo apoio ao meu desenvolvimento como profissional e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa.

Agradeço aos técnicos administrativos da UFERSA em especial a Carolina Pinheiro, José Gustavo, Luiz Odonil, Vilma de Andrade e Tatiana Barreto pela amizade, pelos ensinamentos e pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço à associação de meliponicultores AMEP em especial a Victor hugo, Ivan, Erione e Milton por todo suporte dado no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao corpo docente da UFERSA, em especial a Kátia Gramacho, Edna Aroucha, Marlon Feijó pela ajuda na construção do conhecimento e desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço a equipe do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, em especial a Dayse Ariane, Maria Gabriela e Ayala do Vale por todo auxílio, amizade e conselhos.

Agradeço a Palloma Vitória, Salenilda Firmino, Flávio Santana, Érica Lorena e Leônia Régia pela amizade construída ao longo desse período de mestrado.

Em especial agradeço a Joice Souza pela parceria, pela amizade, pela ajuda nos experimentos por todo apoio emocional e conselhos.

Agradeço a Breno Holanda, Francilane Nascimento, Darliane Souza e Luiz Fernando por todo o apoio nas horas difíceis dessa jornada.

Agradeço aos membros da banca examinadora por aceitarem avaliar e contribuir com o trabalho.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a realização dessa pesquisa e com minha formação profissional e pessoal. A todos os meus sinceros agradecimentos.

"Quando chove as abelhas
Começam a trabalhar:
Moça-branca e a pimenta,
Mandaçaia e mangangá;
Canudo, Mané-de-Abreu,
Tubiba e irapuá."

"Ronca a tataira,
Faz boca o limão,
Zoa o sanharão,
Trabalha a jandaíra,
Busca flor a cupira
Faz mel o enxú,
Zoa o capuchú,
Vai à fonte a jataí,
Campeia o enxuí,
Faz mel a urucu."

Francisco Romano (1840-1891)

RESUMO

Objetivou-se identificar a evolução tecnológica dos produtos derivados de abelhas sem ferrão e caracterizar o mel fresco e maturado, a geoprópolis e o saburá de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*). Foram consultados quatro bancos de dados de escritórios de patentes, *Patentscope*, *Espacenet*, LATIPAT, INPI. Também foram coletadas 30 amostras de mel, 10 amostras de geoprópolis e 6 amostras de saburá de abelha jandaíra em diferentes municípios da região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil. Avaliou-se as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais das amostras de geoprópolis *in natura*, dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis produzidos, das amostras de mel *in natura* e do saburá. Também foram avaliados mensalmente as características do mel durante o processo de maturação de 120 dias. Foram encontradas 58 patentes publicadas relacionadas a produtos meliponícolas. O Brasil se destacou por apresentar 41,4 % de todas as patentes depositadas analisadas. A análise dos códigos de classificação IPC demonstrou que 29,3 % dos documentos de patentes foram registrados na subclasse A61K 35/644 de preparações medicinais contendo cera de abelha, própolis, geleia real ou mel. O teor de matéria mineral nas amostras de geoprópolis *in natura* variou de 37,5 a 82,0 g/100 g. Foi possível observar nos extratos variações de pH entre 4,15 a 5,9, densidade entre 0,796 a 0,859 g/cm³, teor de resíduo seco entre 1,0 a 17,9 g/100 ml, teor de compostos fenólicos totais 3,2 a 41,7 mg EAQ/g, de flavonoides 1,2 a 49,0 mg EQ/g e CE₅₀ 0,16 a 4,16 µg/ml. Em relação a atividade antimicrobiana dos extratos foi possível identificar maiores valores de inibição frente a microrganismos gram-positivos quando comparado a cepas gram-negativas, porém a maioria dos extratos conseguiram inibir total ou parcialmente o crescimento microbiano. Quanto as características sensoriais, tanto a geoprópolis *in natura* quanto os extratos hidroetanólicos de geoprópolis mostraram características sensoriais diversas. Os únicos microrganismos com crescimento detectado nas amostras de mel *in natura* foram os bolores e leveduras com valores de contagem microbiana variando entre < 1,18 e 4,85 Log₁₀ UFC/g. Nas amostras *in natura* foram encontrados valores médios de umidade 26,5 g/100 g; pH 3,5; acidez livre 36,14 mEq/kg; hidroximetilfurfural 6,15 mg/kg; açúcares redutores 67,58 g/100 g; sacarose aparente 2,89 g/100 g; sólidos insolúveis em água 0,1 g/100 g, cinzas 0,27 g/100 g e 44 % das amostras analisadas apresentaram coloração branco d'água (0 a 8 mm Pfund). No tempo inicial da maturação, o mel apresentou presença de bolores e leveduras, 3,6 ± 0,4 Log₁₀ UFC/g, bactérias mesófilas totais 4,1 ± 0,2 Log₁₀ UFC/g e bactérias ácido lácticas 4,3 ± 0,1 Log₁₀ UFC/g, porém após primeiro mês de maturação a presença desses microrganismos nas amostras foi praticamente zero (< 1,2 e < 1,5 Log₁₀ UFC/g). Observou-se que o pH do mel é uma importante medida para acompanhar as alterações nele ocorrem durante o processo de maturação. Durante os 120 dias do processo o pH se tornou mais ácido gradativamente, enquanto o teor de acidez se elevava (r = -0,945; p<0,001), o teor de açúcares redutores reduzia (r = 0,962; p<0,001) e o mel se tornava mais denso (r = -0,861; p<0,001). Após 120 dias do processo de maturação, o mel apresentou aroma ácido, sabor agridoce, cor e consistência líquida inalteradas. Não houve detecção de microrganismos nas amostras de saburá analisadas, indicativo de que os processos bioquímicos e microbianos gerenciados pelas abelhas são eficientes em inibir a deterioração deste produto. Quanto aos parâmetros físico-químicos as amostras de saburá apresentaram teores médios de umidade de 27,2 g/100 g; proteína bruta 31,1 g/100 g; açúcares totais 55,2 g/100 g; pH 3,5 e acidez 1023,7 mEq/kg. Os produtos meliponícolas da abelha jandaíra demonstraram possuir potencial de mercado devido às suas características diferenciadas e propriedades biológicas.

Palavras-chave: Meliponini; Propriedade Intelectual; Bioativos naturais; Processos fermentativos

ABSTRACT

The objective of this study was to identify the technological evolution of the stingless bees' products and to characterize the fresh and matured honey, the geopropolis and the saburá of *Melipona subnitida*. Four patent databases were consulted, Patentscope, Espacenet, LATIPAT, INPI. Thirty honey samples, ten geopropolis samples and six saburá samples were also collected in different cities in the semi-arid region of Rio Grande do Norte state, Brazil. The physical-chemical, microbiological, and sensory characteristics of the geopropolis samples, the hydroethanolic extracts of geopropolis, the fresh honey samples and the saburá samples were evaluated. The honey characteristics were also evaluated during the 120-day maturation process. 58 filed patents were found related to stingless bee products in the world. Brazil has been highlighted for presenting 41,4% of all filed patents analyzed. The analysis of the IPC classification codes showed that 29,3% of patent documents were registered in subclass A61K 35/644 of medicinal preparations containing beeswax, propolis, royal jelly or honey. The mineral content in the geopropolis samples in natura varied from 37,5 to 82,0 g/100 g. It was possible to observe in the extracts pH variations between 4,15 to 5,9, density between 0,796 to 0,859 g/cm³, dry residue content between 1,0 to 17,9 g/100 ml, content of total phenolic compounds 3,2 to 41,7 mg EAQ/g, flavonoids 1,2 to 49,0 mg EQ/g and EC₅₀ 0.16 to 4.16 µg/ml. Regarding the antimicrobial activity of the extracts, it was possible to identify higher values of inhibition against gram-positive microorganisms than gram-negative strains, however most of the extracts were able to inhibit microbial growth. Both the fresh geopropolis and the geopropolis hydroethanolic extracts showed a variety of sensory characteristics. The only microorganisms detected in fresh honey samples were molds and yeasts with microbial count values ranging between <1,18 to 4,85 Log₁₀ CFU/g. In the fresh samples, average values of humidity were found: 26,5 g/100 g; pH 3,5; free acidity 36,14 mEq/kg; hydroxymethylfurfural 6,15 mg / kg; reducing sugars 67,58 g/100 g; apparent sucrose 2,89 g/100 g; water insoluble solids 0,1 g/100 g, ash 0,27 g/100 g and 44% of the analyzed samples showed water white color (0 to 8 mm Pfund). At the initial time of maturation, honey presented molds and yeasts, 3,6 ± 0,4 Log₁₀ CFU/g, total mesophilic bacteria 4,1 ± 0,2 Log₁₀ CFU/g and lactic acid bacteria 4,3 ± 0,1 Log₁₀ CFU/g, but after the first month of maturation, the presence of these microorganisms in the samples was almost zero (<1,2 and <1,5 Log₁₀ CFU / g). It was observed that the pH of honey is an important measure to identify the changes that occur during the maturation. During the 120 days of the process, the pH gradually became more acidic, while the acidity content increased (r = -0,945; p <0.001), the reducing sugar content decreased (r = 0,962; p <0,001) and honey it became denser (r = -0,861; p <0,001). After 120 days of the maturation process, the honey showed an acidic aroma, bittersweet flavor, the color and the liquid consistency were unchanged. There was no detection of microorganisms in the analyzed saburá samples, indicating that the biochemical and microbial processes managed by the stingless bees were efficient in inhibiting the product deterioration. As for the physical-chemical parameters, the samples of saburá showed average moisture content of 27,2 g/100 g; protein 31,1 g/100 g; total sugars 55,2 g/100 g; pH 3,5 and acidity 1023,7 mEq/kg. The jandaira products have great market potential due to their different characteristics and biological properties.

Keywords: Meliponini, Intellectual property, Bioactive potential, Fermentation processes

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II – PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PRODUTOS MELIPONÍCOLAS

- Figura 1.** Número de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura publicadas entre os anos de 2000 e 2020.....37
- Figura 2.** Quantidade de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020, conforme o país de depósito.....38
- Figura 3.** Códigos IPC mais citados em patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020.....41
- Figura 4.** Quantidade de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020 no Brasil conforme a unidade federativa de depósito.....43
- Figura 5.** Códigos IPC mais citados em patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020 no Brasil.....44
- Figura 6.** Abelhas sem ferrão envolvidas em processos de patentes brasileiras de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020.....46

CAPÍTULO III – A GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA

- Figura 1.** Fluxograma experimental simplificado.....56
- Figura 2.** Municípios do estado do Rio Grande do Norte onde foram coletadas amostras de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).....57
- Figura 3.** Regressão linear entre o teor de cinzas na geoprópolis *in natura* e os teores de resíduo seco, compostos fenólicos totais e flavonoides nos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*).....69

CAPÍTULO IV – O MEL MATURADO DA ABELHA JANDAÍRA

- Figura 1.** Fluxograma experimental simplificado.....94
- Figura 2.** Municípios do estado do Rio Grande do Norte onde foram coletadas as amostras do mel de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).....95

Figura 3.	Fermentador artesanal para maturação de mel abelha jandaíra (<i>Melipona subnitida</i> Ducke).....	102
Figura 4.	Percentual de distribuição da cor do mel <i>in natura</i> de <i>Melipona subnitida</i> provenientes da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte (n = 30).....	111
Figura 5.	Interação entre parâmetros físico-químicos de <i>M. subnitida</i> ao longo de 120 dias do processo de maturação.....	114

CAPÍTULO V – O SABURÁ DA ABELHA JANDAÍRA

Figura 1.	Potes de saburá de <i>Melipona subnitida</i> em meliponário localizado em zona urbana do município de Mossoró, Brasil.....	128
------------------	--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III – A GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA

- Tabela 1.** Cepas bacterianas utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de abelha jandaíra.....64
- Tabela 2.** Microrganismos pesquisados na geoprópolis bruta e nos respectivos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....67
- Tabela 3.** Características físico-químicas da geoprópolis bruta e dos respectivos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....68
- Tabela 4.** Características sensoriais da geoprópolis bruta e dos respectivos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....70
- Tabela 5.** Potencial antioxidante de extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.....71
- Tabela 6.** Correlação de Spearman (rs) entre o teor de cinzas presente na geoprópolis bruta e o resíduo seco, o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis.....72
- Tabela 7.** Classificação do potencial antimicrobiano de extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* frente a cepas padrões de microrganismos.....72
- Tabela 8.** Classificação do potencial antimicrobiano de extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal.....73

CAPÍTULO IV – O MEL MATURADO DA ABELHA JANDAÍRA

- Tabela 1.** Escala Pfund para classificação de cores de méis.....99
- Tabela 2.** Características microbiológicas do mel *in natura* de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio grande do Norte, Brasil.107
- Tabela 3.** Características físico-químicas do mel *in natura* de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio grande do Norte, Brasil.....109
- Tabela 4.** Características microbiológicas do mel de *Melipona subnitida* ao longo do período de maturação.....112
- Tabela 5.** Características físico-químicas do mel de *Melipona subnitida* ao longo do período de maturação.....112

Tabela 6.	Características sensoriais do mel de <i>Melipona subnitida</i> ao longo do período de maturação.....	115
------------------	--	-----

CAPÍTULO V – O SABURÁ DA ABELHA JANDAÍRA

Tabela 1.	Microrganismos pesquisados no saburá <i>in natura</i> de abelha jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) coletados em zona urbana e rural do município de Mossoró, Brasil.	131
------------------	---	-----

Tabela 2.	Características físico-químicas do <i>saburá in natura</i> de abelha jandaíra (<i>Melipona subnitida</i>) coletados em zona urbana e rural do município de Mossoró, Brasil.....	133
------------------	---	-----

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo Geral	21
2.2 Objetivos Específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 Abelhas: Importância econômica	22
3.2 Abelhas do Brasil: Gênero <i>Melipona</i>	22
3.2.1 A abelha Jandaíra.....	22
3.3 O mel da abelha jandaíra	23
3.3.1 Deterioração do mel de abelha jandaíra	23
3.3.2 A técnica de maturação do mel das abelhas sem ferrão	24
3.4 A Geoprópolis da abelha jandaíra	24
3.5 O saburá da abelha jandaíra	25
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO II - PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PRODUTOS MELIPONÍCOLAS	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 METODOLOGIA	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.1 Panorama mundial de patentes relacionadas a meliponicultura e produtos meliponícolas nos últimos 20 anos.....	37
3.2 Países Produtores de patentes relacionadas à meliponicultura e produtos meliponícolas nos últimos 20 anos.....	38
3.3 Panorama de Patentes de acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC)	40
3.4 Cenário Brasileiro de Depósito de Patentes Relacionadas à Produtos Meliponícolas nos Últimos 20 anos	42
3.4.1 Espécies de abelhas sem ferrão brasileiras envolvidas em processos de patentes	45
3.4.2 O Nordeste e o semiárido brasileiro no contexto da inovação tecnológica dos produtos meliponícolas.....	46

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO III - A GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA	52
RESUMO	53
ABSTRACT	54
1 INTRODUÇÃO	55
2 MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 EXPERIMENTO 1 - Caracterização da geoprópolis bruta de <i>Melipona subnitida</i> da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.	57
2.1.1 Análise microbiológica da geoprópolis bruta	57
2.1.1.1 Contagem de bactérias mesófilas totais	58
2.1.1.2 Detecção e contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	58
2.1.1.3 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	58
2.1.1.4 Contagem de Bolores e Leveduras	59
2.1.2 Análises físico-químicas e sensoriais da geoprópolis <i>in natura</i>	59
2.1.2.1 Cinzas	59
2.1.2.2 Perda por dessecação	60
2.1.2.3 Características sensoriais da geoprópolis bruta	60
2.2 EXPERIMENTO 2 – Produção e caracterização de extratos de geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i> da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte	60
2.2.1 Produção de extratos de geoprópolis	60
2.2.2 Análises da segurança microbiológica dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis	61
2.2.3 Análises das características físico-químicas dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis	61
2.2.3.1 Determinação de resíduo seco (extrato seco) em amostras de geoprópolis ...	61
2.2.3.2 Determinação do pH	61
2.2.3.3 Determinação da densidade relativa	62
2.2.3.4 Compostos Fenólicos Totais (CFT)	62
2.2.3.5 Flavonoides Totais (FLT)	63
2.2.4 Características sensoriais dos extratos de geoprópolis	63
2.2.5 Potencial bioativo dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis da abelha jandaíra	63
2.2.5.1 Atividade antioxidante (AA)	63
2.2.5.2 Atividade antimicrobiana	64
2.2.5.2.1 Aquisição das Cepas	64

2.2.5.2.2 - Preparação do inóculo	65
2.2.5.2.3 - Teste de difusão em discos	65
2.3 Análises estatísticas.....	66
3 RESULTADOS	67
3.1 Microbiologia de geoprópolis <i>in natura</i> e de extratos hidroetanólicos de <i>M. subnitida</i>	67
3.2 Características físico-químicas de geoprópolis <i>in natura</i> e de extratos hidroetanólicos de <i>M. subnitida</i>	68
3.3 Características sensoriais de geoprópolis <i>in natura</i> e de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de <i>M. subnitida</i>	69
3.4 Potencial bioativo de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de <i>M. subnitida</i>	70
3.4.1 Potencial antioxidante dos extratos hidroetanólicos de <i>M. subnitida</i>	70
3.4.2 Potencial Antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de <i>M. subnitida</i>	72
4 DISCUSSÃO.....	74
4.1 A geoprópolis como indicador sanitário do manejo de colmeias de <i>Melipona subnitida</i>	74
4.2 Composição físico-química e compostos bioativos da geoprópolis da abelha jandaíra	76
4.2.1 Composição físico-química da geoprópolis e de extratos de geoprópolis de abelha jandaíra	76
4.2.2 Potencial antioxidante.....	77
4.2.2.1 Uso de extratos de geoprópolis de <i>M. subnitida</i> como antioxidante natural para alimentos	78
4.2.3 Potencial Antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis	79
4.2.3.1 Uso de extratos de geoprópolis de <i>M. subnitida</i> como agente antimicrobiano para alimentos	80
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
REFERÊNCIAS.....	83
CAPÍTULO IV - O MEL MATURADO DA ABELHA JANDAÍRA.....	89
RESUMO	90
ABSTRACT.....	91
1 INTRODUÇÃO.....	92
2 METODOLOGIA.....	94
2.1 EXPERIMENTO 1 – Caracterização do Mel fresco de <i>Melipona subnitida</i> da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.	94
2.1.1 – Análise das características do mel de abelha jandaíra <i>in natura</i>	95
2.1.1.1 - Umidade	96

2.1.1.2	pH.....	96
2.1.1.3	Acidez livre	96
2.1.1.4	Hidroximetilfurfural – HMF	96
2.1.1.5	Açúcares redutores.....	97
2.1.1.6	Sacarose aparente.....	97
2.1.1.7	Sólidos insolúveis em água	98
2.1.1.8	Cinzas	98
2.1.1.9	Cor	98
2.1.2	Análise das características microbiológicas do mel de abelha jandaíra <i>in natura</i>	99
2.1.2.1	Detecção e contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	99
2.1.2.2	Contagem de <i>Staphylococcus</i> sp.....	100
2.1.2.3	Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	100
2.1.2.4	Contagem de Bolores e Leveduras	100
2.2	EXPERIMENTO 2 – Produção e caracterização do mel maturado de <i>Melipona subnitida</i> da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.....	101
2.2.1	Produção do mel de abelha jandaíra maturado.....	101
2.2.1.1	Construção e caracterização de um fermentador para maturação de mel de abelhas sem ferrão	101
2.2.1.2	Processo de Maturação do mel de abelha jandaíra	102
2.2.2	Análises das características físico-químicas e microbiológicas do mel de abelha jandaíra durante o processo de maturação.....	103
2.2.2.1	Determinação de sólidos solúveis totais (° BRIX).....	103
2.2.2.2	Densidade.....	103
2.2.2.3	Compostos Fenólicos Totais	104
2.2.2.4	Flavonoides Totais	104
2.2.2.5	Capacidade antioxidante	105
2.2.2.6	Contagem de bactérias mesófilas totais	105
2.2.2.7	Contagem de bactérias ácido lácticas viáveis.....	106
2.3	Análises das características sensoriais do mel ao longo do período de maturação... ..	106
2.4	Análises estatísticas dos dados	106
3	RESULTADOS	107
3.1	Características do mel fresco de abelha jandaíra	107
3.1.1	Características microbiológicas do mel <i>in natura</i> de <i>M. subnitida</i>	107
3.1.2	Características físico-químicas do mel <i>in natura</i> de <i>M. subnitida</i>	108
3.2	Caracterização do processo de maturação do mel da abelha Jandaíra	111

3.2.1 Características microbiológicas do mel de <i>M. subnitida</i> ao longo do processo de maturação.....	111
3.3.2 Características físico-químicas do mel de <i>M. subnitida</i> ao longo do processo de maturação.....	112
3.2.3 Características sensoriais do mel de <i>M. subnitida</i> ao longo do processo de maturação.....	114
4 DISCUSSÃO.....	116
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	118
REFERÊNCIAS.....	119
CAPÍTULO V - O SABURÁ DA ABELHA JANDAÍRA.....	123
RESUMO	124
ABSTRACT.....	125
1 INTRODUÇÃO.....	126
2 MATERIAL E MÉTODOS	127
2.1 Coleta do material	127
2.2 Análises Microbiológicas	128
2.2.1 Contagem de bactérias mesófilas totais.....	128
2.2.2 Detecção e contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	129
2.2.4 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	129
2.2.5 Contagem de Bolores e Leveduras	130
2.3 Análises Físico-químicas.....	130
2.3.1 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)	130
2.3.2 pH e acidez livre	131
2.3.2 Análises estatísticas	131
3.1 A microbiologia do saburá da abelha jandaíra	131
3.2 Características físico-químicas do saburá da abelha jandaíra e implicações legais ..	132
4 CONCLUSÃO	135
REFERÊNCIAS	135

CAPÍTULO I
CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

As abelhas são um grupo de insetos pertencentes à família Apidae com mais de 20.000 espécies conhecidas ao redor do mundo, estão presentes em praticamente todos os ecossistemas terrestres (MICHENER, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002; PEDRO, 2014).

Dentre desse grupo destacam-se as abelhas sem ferrão, conhecidas como meliponíneos, grupo de insetos eussociais pertencentes a família Apidae, tribo Meliponini, que possuem o ferrão atrofiado (KERR; LELLO, 1962; MICHENER, 2007).

Com mais de 500 espécies já catalogadas, os meliponíneos possuem ampla distribuição na região tropical e subtropical da América, África, Ásia e Oceania (MICHENER, 2013).

Desde a antiguidade as abelhas sem ferrão são criadas para diversas finalidades. Em civilizações passadas, o pólen, o mel e a própolis dos meliponíneos eram utilizadas na medicina, em rituais religiosos e na alimentação humana (KERR, 1980; CRANE, 1999; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; QUEZADA-EUÁN *et al.*, 2018).

O pólen, o mel e a própolis produzidos por abelhas sem ferrão são denominados produtos meliponícolas (BORGES, 2011). Estes produtos possuem características singulares que podem variar de acordo com a espécie criada, com o clima e com a origem botânica e geográfica de cada localidade. As peculiaridades existentes em cada produto meliponícola representam uma diversidade de compostos químicos bioativos com potenciais farmacológicos e nutricionais (RAO *et al.*, 2016; LAVINAS *et al.*, 2019; AL-HATAMLEH *et al.*, 2020).

O Brasil possui grande potencial na produção meliponícola pois abriga uma grande diversidade de espécies de abelhas sem ferrão aptas a produção de mel, pólen e própolis em escalas comerciais (PEDRO, 2014; JAFFÉ *et al.*, 2015).

Dentre a diversidade de abelhas sem ferrão do Brasil, o gênero *Melipona* Illiger 1806 ganhou notoriedade devido ao seu potencial de produção de mel, pólen e própolis (ALVES, 2013). Uma espécie deste gênero com grande potencial econômico é a abelha jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke 1910. Essa espécie ocorre na região semiárida do Nordeste brasileiro principalmente nos estados do Ceará, Paraíba e Rio Grande do Norte (ZANELLA; MARTINS, 2003; CARVALHO; ZANELLA, 2017).

A jandaíra é utilizada com frequência na meliponicultura regional desses estados e suas colônias são amplamente criadas e multiplicadas para a produção de mel, própolis e pólen. Em média uma colmeia da espécie pode atingir produção ótima de 1,8 L de mel ao ano (KOFFLER *et al.*, 2015; AIRES-NETO; CARVALHO, 2017; DANTAS *et al.*, 2020).

A características particulares do mel, da geoprópolis e do saburá (pólen fermentado) da abelha jandaíra os distinguem dos produtos apícolas, derivados das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*), amplamente comercializados e com padrões de consumo bem estabelecidos por legislação federal (BRASIL, 2000; BRASIL, 2001; ALVES, 2013). A Ausência de padronização e de legislação específica destinada a regulamentar a produção e comercialização de produtos meliponícolas tornou-se um dos grandes gargalos para a comercialização dos produtos da abelha Jandaíra (DANTAS *et al.*, 2020).

A realização de estudos que busquem padronizar os meios de produção e os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos produtos de abelha jandaíra são de extrema importância para a regulamentação e consolidação da meliponicultura na região semiárida brasileira. Diante desta problemática, esta pesquisa objetivou caracterizar o mel, a geoprópolis e o saburá de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o mel, a geoprópolis e o saburá de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a evolução tecnológica dos produtos derivados de abelhas sem ferrão;
- Avaliar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da geoprópolis e de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de abelha jandaíra;
- Analisar o potencial antimicrobiano e antioxidante de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de abelha jandaíra;
- Caracterizar o mel *in natura* de abelha Jandaíra (*Melipona subnitida*);
- Caracterizar o método de maturação (fermentação controlada) do mel de abelha Jandaíra (*Melipona subnitida*);
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do saburá de abelha jandaíra do semiárido potiguar.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Abelhas: Importância econômica

As abelhas, grupo de insetos pertencentes à família Apidae (SILVEIRA *et al.*, 2002) são conhecidas principalmente pelo seu produto de maior popularidade e consumo, o mel. Entre 2000 e 2011, as exportações de mel natural no mundo atingiram cerca de 4,8 milhões de toneladas e um valor real aproximado de US\$ 12,5 bilhões (PAULA *et al.*, 2016). Outros produtos de alto valor comercial também podem ser obtidos da criação de abelhas como a própolis e o pólen (KRELL, 1996).

3.2 Abelhas do Brasil: Gênero *Melipona*

As abelhas estão presentes nas zonas tropicais e temperadas do planeta exibindo grande diversidade de espécies (PEDRO, 2014). De acordo com Michener (2000), em todo o mundo são conhecidas cerca de 20.000 espécies de abelhas.

O Brasil é um país com extensa biodiversidade de abelhas, dentre elas pode-se destacar as abelhas sociais nativas, também chamadas de meliponíneos, que são as únicas a apresentar ferrão atrofiado (KERR; LELLO, 1962). A biodiversidade brasileira apresenta cerca de 250 espécies conhecidas e catalogadas desse grupo (PEDRO, 2014). Dentre as abelhas sem ferrão, o gênero *Melipona* compreende o de maior número em espécies no Brasil, destacando-se pela grande riqueza em biodiversidade. O gênero *Melipona* Illiger (1806) tem ganhado respaldo em função do seu potencial econômico e ecológico, com destaque para a espécie *Melipona subnitida* Ducke (1910) (jandaíra), adaptada à região semiárida (MAIA-SILVA *et al.*, 2015).

3.2.1 A abelha Jandaíra

A Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) é uma abelha sem ferrão que ocorre em toda a região semiárida do Nordeste brasileiro (ZANELLA; MARTINS, 2003; CARVALHO; ZANELLA, 2017). A abelha jandaíra habita colmeias perenes com uma única rainha, de expectativa de vida de 4 a 5 anos e operárias de poucos meses (SOUZA *et al.*, 2018). Segundo Koffler *et al.* (2015) essa espécie é utilizada com frequência na meliponicultura regional e suas colônias são amplamente criadas e multiplicadas para a produção de mel.

A convivência da abelha jandaíra por milhares de anos com o clima semiárido resultou na evolução de várias características fisiológicas e comportamentais que permitem a esta espécie sobreviver sob condições adversas de seca e escassez de alimento (MAIA-SILVA *et al.*, 2015).

Uma das estratégias desenvolvidas pela *M. subnitida* consiste na coleta do máximo de néctar e pólen possível de fontes altamente nutritivas durante a estação chuvosa (HRNCIR *et al.*, 2019). O néctar coletado passa por modificações bioquímicas e microbiológicas coordenadas pelas abelhas operárias e é convertido em mel. O pólen também passa por processos microbiológicos e bioquímicos de fermentação e ao final deles recebe o nome de saburá (VILLAS-BOAS, 2018; ALVES *et al.*, 2018).

3.3 O mel da abelha jandaíra

O mel da abelha jandaíra é um alimento de cor, aroma, sabor e consistência únicos muito apreciado pelo mercado consumidor da região Nordeste do Brasil. Geralmente caracteriza-se como de sabor meio ácido, com textura fina, pouco viscoso, de cor clara e com aroma característico (NOGUEIRA-NETO, 1997; DANTAS *et al.*, 2020).

De acordo com Silva e Pinheiro (2017), o mel de *Melipona subnitida* apresenta características peculiares que o distinguem do mel de abelha africanizada (*Apis mellifera*), principalmente em relação à umidade, viscosidade, sólidos insolúveis, acidez e açúcares redutores.

A produção do mel em si também é peculiar, em média uma colmeia da espécie pode atingir uma produção ótima de 1,8 L de mel ao ano (KOFFLER *et al.*, 2017). Devido a isso e ao conhecimento tradicional que atribui a esse alimento propriedades medicinais (AIRES-NETO; CARVALHO, 2017), o mel de abelha jandaíra possui alto valor agregado (VENTURIERI *et al.*, 2012; KOFFLER *et al.*, 2017). No estado do Rio Grande do Norte, a venda desse mel proporciona renda para pequenos produtores e representa uma excelente fonte de lucro, devido ao elevado valor de mercado do produto e do baixo investimento para criação (KOFFLER *et al.*, 2015; AIRES-NETO; CARVALHO, 2017).

3.3.1 Deterioração do mel de abelha jandaíra

Apesar de ser considerado um alimento resistente, no mel também podem ocorrer processos de deterioração. Ainda que alguns fatores intrínsecos do mel sejam limitantes ao

crescimento de microrganismos patogênicos, os fungos e as leveduras osmofílicas podem se desenvolver (DIAS *et al.*, 2014). O teor de umidade do mel é altamente importante para sua vida útil (PÉREZ-ARQUILLUÉ *et al.*, 1994). Em geral, o alto teor de umidade causa fermentação do mel, deterioração e perda de sabor, levando à perda de qualidade (COSTA *et al.*, 1999).

Associados a métodos de manejo, colheita e beneficiamento do mel que não obedecem às Boas Práticas de Fabricação e à umidade elevada (21% a 45%). A presença de microrganismos, podem acarretar problemas de conservação do produto, reduzindo sua vida de prateleira, podendo até mesmo torná-lo impróprio para o consumo humano (ALVES *et al.*, 2011).

Algumas técnicas de conservação são indicadas para a conservação do mel. Dentre os métodos aplicados destacam-se: refrigeração logo após a colheita; desidratação, ocasionando a redução da umidade; fermentação do mel colhido pela sua própria microbiota, provocando um aumento da acidez; e processo térmico de pasteurização, visando à redução da carga microbiana vegetativa (DIAS *et al.*, 2014). Porém, os métodos conservativos aplicados raramente são realizados corretamente e o produto finalizado não passa por uma avaliação adequada antes de ser comercializado (CAMARGO *et al.*, 2017).

3.3.2 A técnica de maturação do mel das abelhas sem ferrão

Um método de conservação que vem ganhando destaque para a preservação do mel é a maturação (fermentação controlada). A maturação do mel das abelhas sem ferrão é uma metodologia que consiste em propiciar sobre condições controladas o processo de fermentação natural que ocorre após a extração do mel (VILLAS-BOAS, 2018).

O processo de maturação do mel de abelhas sem ferrão está ligado ao conceito de que nem todo mel fermentado é mel estragado. Quando extraído através de práticas higiênicas e submetido a um período de maturação que dura em média quatro a seis meses, o mel tem sua vida de prateleira aproximada de dois anos (RIBEIRO *et al.*, 2018).

No mel das abelhas sem ferrão, a maturação incrementa as características sensoriais do produto e é utilizada para preservação, pois inibe o desenvolvimento de patógenos e microrganismos deteriorantes (CAMARGO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018).

3.4 A Geoprópolis da abelha jandaíra

A própolis é um produto resinoso produzido por espécies de abelhas eussociais a partir de substâncias coletadas de brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos de plantas. As abelhas coletam essas substâncias e as modificam na colmeia através da adição de cera, pólen, e produtos do seu metabolismo, como as enzimas salivares (BRASIL, 2001). A geoprópolis é um tipo especial de própolis, preparada pelas abelhas sem ferrão e consiste numa mistura de resinas vegetais, cera e argila (VILLAS-BOAS, 2018).

A composição química da geoprópolis depende da especificidade da flora no local de coleta. Muitos constituintes foram identificados a partir da geoprópolis de meliponíneos. Compostos fenólicos, como flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres de ácido fenólico, foram relatados como principais constituintes da própolis a partir de zonas tropicais (BANKOVA, 2009; SANTOS *et al.*, 2017; LAVINAS *et al.*, 2019).

A atividade biológica da geoprópolis normalmente depende do número de compostos fenólicos presentes, especialmente os flavonóides, e estes compostos são indicados como sendo os responsáveis pela grande variedade de propriedades terapêuticas, tais como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e antivirais, e também a característica antioxidante (SILVA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2017).

Devido à sua alta concentração de compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes, a geoprópolis pode ser considerada um potencial conservante para aumentar a vida de prateleira de produtos de origem animal. Nesses alimentos a geoprópolis pode atuar como antioxidante e no controle da carga microbiana deteriorante e patogênica (DUMAN; OZPOLAT, 2015; KUNRATH *et al.*, 2017; PAYANDAN *et al.*, 2017; KHODAYARI *et al.*, 2019).

3.5 O saburá da abelha jandaíra

As abelhas do gênero *Melipona* armazenam o pólen que coletam das plantas em potes. Este pólen é fermentado como estratégia de conservação e preservação do seu valor nutricional e ao final do processo recebe o nome de saburá (ALVES, 2018).

No Nordeste brasileiro vem crescendo a comercialização do pólen das abelhas meliponas devido ao seu alto valor nutricional, propriedades nutricionais e medicinais e seu sabor único (ALVES; CARVALHO, 2018).

O saburá da abelha jandaíra apresenta grande potencial nutricional. O alto teor de aminoácidos essenciais, minerais, flavonoides e de açúcar D-manitol agregam características funcionais a esse alimento (SILVA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2014).

Apesar de ser um produto com grande potencial de mercado no Brasil. A produção e comercialização do saburá de abelha jandaíra ainda sofre vários entraves. As características físico-químicas e microbiológicas do produto ainda permanecem desconhecidas, pois poucos estudos foram realizados para caracterizá-lo. A falta de conhecimento na área é um impedimento para o desenvolvimento de técnicas de padronização que impulsionem a regulamentação, produção e comercialização do produto em larga escala (ALVES; CARVALHO, 2018).

REFERÊNCIAS

- AIRES-NETO, T.; CARVALHO, F. C. **A meliponicultura tradicional no Rio Grande do Norte e arredores.** In: FONSECA, V. L. I.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. A abelha Jandaíra: no passado, presente e no futuro. Mossoró: EduFERSA. p. 109-114, 2017.
- AL-HATAMLEH, M.; BOER, J. C.; WILSON, K. L.; PLEBANSKI, M.; MOHAMUD, R.; MUSTAFA, M. Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p.923, 2020.
- ALVES, R. M. O. **Production and Marketing of Pot-Honey.** In: VIT, P.; PEDRO, S. R.; ROUBIK, D., editors. Pot-Honey. Springer; New York, NY, USA, pp. 541–556, 2013.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L. Pot-Pollen ‘Samburá’ Marketing in Brazil and Suggested Legislation. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Eds.). **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology.** Springer International Publishing, p. 435–443, 2018a.
- ALVES, R. M. O.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Chemical, Microbiological, and Palynological Composition of the ‘Samburá’ *Melipona scutellaris* Pot-Pollen. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Eds.). **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology.** Springer International Publishing, p. 349–360, 2018b.
- ALVES, T. T. L.; MENESES, A. R. V.; SILVA, J. N.; PARENTE, G. D. L.; NETO, J. P. H. Caracterização físico química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 91-97, 2011.
- BANKOVA, V. “Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds”. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 1, p. 23–28, 2009.
- BORGES, L. C. M. **Os termos da meliponicultura: uma abordagem socioterminológica.** 197f. Dissertação (Mestrado em Letras) – Instituto de Letras e Comunicação, Universidade Federal do Pará, Belém, 197 f., 2011.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000.** Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p.16-17, 2000.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001.** Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da União], Brasília, DF, Seção 1, p. 18, 2001.
- CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 20, 2017.

CARVALHO, A. T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 41-72, 2017.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, Springer Verlag, v. 37, n. 2, pp. 275-292, 2006.

COSTA, L.; ALBUQUERQUE, M.; TRUGO, L.; QUINTEIRO, L.; BARTH, O.; RIBEIRO, M.; MARIA, C. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. **Food Chemistry**, v. 65, p. 347-352, 1999.

CRANE, E. **The World History of Beekeeping and Honey Hunting**. Duckworth; London, UK, 682 pp., 1999.

DANTAS, M. C. A. M.; BATISTA, J. L.; DANTAS, P. A. M.; DANTAS, I. M.; DIAS, V. H. P.; ANDRADE FILHO, F. C.; MOREIRA, J. N.; MIELEZRSKI, G. L. N.; SILVA, M. G.; MAIA, A. G.; MEDEIROS, A. C.; MARACAJÁ, P. B. Stingless bee and its socioeconomic potential in the States of Paraíba and Rio Grande do Norte. **Research Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3309107939, 2020.

DIAS, M. P. S.; CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTELI, M. N.; BERTO, M. I. **Levantamento de tecnologias de conservação de mel de abelhas nativas em função de suas propriedades físico-químicas**. Anais do CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC, v. 8, 2014.

DUMAN, M.; ÖZPOLAT, E. Effects of water extract of própolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. **Food Chemistry**, v. 189, p. 80–85, 2015.

FERREIRA, J. M.; FERNANDES-SILVA, C. C.; SALATINO, A.; MESSAGE, D.; NEGRI, G. “Antioxidant Activity of a Geoprópolis from Northeast Brazil: Chemical Characterization and Likely Botanical Origin”. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

HRNCIR, M.; MAIA-SILVA, C.; TEIXEIRA-SOUZA, V. H. S.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Stingless bees and their adaptations to extreme environments. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 205, p. 415–426, 2019.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A. T.; MAIA, U. M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C. A. L.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; FREITAS, B. M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. F.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. 130-111, 2015.

KERR, W. E. **História parcial da ciência apícola no Brasil**. In: Anais do V Congresso Brasileiro de Apicultura. Confederação Brasileira de Apicultura, 1980.

KERR, W. E.; LELLO, E. Sting Glands in Stingless Bees: A Vestigial Character (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 70, p. 190–214, 1962.

KHODAYARI, M.; BASTI, A. A.; KHANJARI, A.; MISAGHI, A.; KAMKAR, A.; SHOTORBANI, P. M.; HAMED, H. Effect of poly (lactic acid) films incorporated with different concentrations of *Tanacetum balsamita* essential oil, propolis ethanolic extract and cellulose nanocrystals on shelf life extension of vacuum-packed cooked sausages. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 19, p. 200–209, 2019.

KOFFLER, S. M.; MENEZES, C.; KLEINERT, P. R.; PEIXOTO, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; POPE, N.; JAFFÉ, R. Temporal Variation in Honey Production by the Stingless Bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): Long-Term Management Reveals its Potential as a Commercial Species in Northeastern Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 858–867, 2015.

KRELL, R.; NATIONS, Food and Agriculture Organization of the United. **Value-added Products from Beekeeping**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1996.

KUNRATH, C. A.; SAVOLDI, D. C.; MILESKI, J. P. F.; NOVELLO, C. R.; ALFARO, A. T.; MARCHI, J. F.; TONIAL, I. B. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 20, 2017.

LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B. C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; RODRIGUES, I. A. Brazilian stingless bee própolis and geoprópolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389-399, 2019.

MAIA-SILVA, C.; HRNCIR, M.; SILVA, C. I.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. **Apidologie**, v. 46, n. 5, p. 631–643, 2015.

MICHENER, C. D. **The Bees of the World**. Baltimore, Johns Hopkins. University Press, 913 p., 2000.

MICHENER, C. D. **The bees of the world. Baltimore, Maryland**. The Johns Hopkins University Press, 2 ed., 953 p., 2007.

MICHENER, C. D. **The meliponini**. In: VIT, P.; PEDRO, S. R.; ROUBIK, D.; editors. Pot-Honey. Springer; New York, NY, USA, ed. 1, pp. 3–17. 2013

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 446p., 1997.

PAULA, M. F.; SANTOS, A. J.; TIMOFEICZYK JUNIOR, R.; HOEFLICH, V. A.; SILVA, J. C. G. L.; ANGELO, H. Análise da competitividade das exportações brasileiras de mel natural, segundo o modelo constant market share e o índice de vantagem comparativa revelada. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 614-620, 2016.

PAYANDAN, E.; SAYYED-ALANGI, S. Z.; SHAMLOOFAR, M.; KOOHSARI, H. Study of Chemical Composition and Efficacy of Different Extracts of Iranian Propolis on the

Microbiological and Sensory Parameters of Minced *Cyprinus carpio* Meat at 4°C Storage. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 5, p. 593–603, 2017.

PEDRO, S. R. M. The Stingless Bee Fauna In Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, v. 61, p. 348-350, 2014.

PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A.; JUAN, T.; HERRERA, A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. **Food Chemistry**, v. 51, p. 207-210, 1994.

SILVA, J. B. A.; PINHEIRO, C. G. M. E. O mel de jandaíra: caracterização físico-química. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 157-160, 2017.

QUEZADA-EUÁN, J.; NATES-PARRA, G.; MAUÉS, M. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. Economic and cultural value of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 534–557, 2018.

RAO, P. V.; KRISHNAN, K. T.; SALLEH, N.; GAN, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

RIBEIRO, G.P.; VILLAS-BÔAS, J. K.; SPINOSA, W.A.; PRUDENCIO, S.H. Influence of freezing, pasteurization, and maturation on Tiúba honey quality. **LWT**, v. 90, p. 607–612, 2018.

SANTOS, H. F.; CAMPOS, J. F.; SANTOS, C. M.; BALESTIERI, J. B. P.; SILVA, D. B.; CAROLLO, C. A.; SOUZA, K. P.; ESTEVINHO, L. M.; SANTOS, E. L. Chemical Profile and Antioxidant, Anti-Inflammatory, Antimutagenic and Antimicrobial Activities of Geopropolis from the Stingless Bee *Melipona orbignyi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 953, 2017.

SILVA, G.; NATIVIDADE, T.; CAMARA, C.; SILVA, E.; SANTOS, F.; SILVA, T. Identification of Sugar, Amino Acids and Minerals from the Pollen of Jandaíra Stingless Bees (*Melipona subnitida*). **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 015-1021, 2014.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA LINS, A. C.; JOSÉ MARIA BARBOSA-FILHO; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 507–511, 2006.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

SILVEIRA, F. A.; MELO, G. A. R.; ALMEIDA, E. A. B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação.** Belo Horizonte, Brasil, ed.1, p. 253, 2002.

SOUZA, F. S.; COSTA, M. A. P. C.; OLIVEIRA, E. J. F.; RIBEIRO, M. F.; SOUZA, B. A.; ARAÚJO, E. D.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CARVALHO, C. A. L. Genetic Variability of *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae) in Introduced and Native Populations. **Journal of Insect Science**, ed. 18, n. 5, v. 4, p. 1–6, 2018.

VENTURIERI, G.; ALVES, D. A.; VILLAS-BÔAS, J. K.; MENEZES, C.; CARVALHO, C. A. L.; NETO, A. V.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; CONTRERA, F.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras para o uso na polinização agrícola.** São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 213-236, 2012.

VILLAS-BÔAS, J. K. **Manual de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas sem Ferrão.** 2. ed. Brasília – DF, Instituto Sociedade, População e Natureza, 2018. 212 p.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. **Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação.** In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da caatinga, Editora Universitária da UFPE, Recife, Brasil, p. 75-134, 2003.

CAPÍTULO II
PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PRODUTOS MELIPONÍCOLAS

RESUMO

O pólen, o mel e a própolis das abelhas sem ferrão, também denominados produtos meliponícolas, podem ser comercializadas de forma direta ou como insumos para fabricação de outras mercadorias de maior valor agregado. Uma forma identificar áreas estratégicas de tecnologias emergentes com potencial de indústria e de mercado é através do estudo e análise de documentos de patentes. Até o presente momento não foram realizados estudos de prospecção tecnológica que avaliassem o panorama mundial e as tendências de mercado dos produtos meliponícolas. Este trabalho objetivou caracterizar a evolução tecnológica dos produtos meliponícolas e dos produtos correlacionados à meliponicultura por meio de um estudo prospectivo em bancos de dados de patentes. Foram consultados quatro bancos de dados de escritórios de patentes reconhecidos internacionalmente, *Patentscope*, *Espacenet*, *LATIPAT*, *INPI*. A análise dos documentos de patentes foi realizada separando os documentos por ano de depósito, país de origem, pelo código internacional de classificação de patentes (IPC) e quando houvesse, pelo código do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT). A pesquisa nos bancos de dados internacionais de patentes retornou um total de 58 patentes publicadas nos últimos 20 anos relacionadas a produtos meliponícolas e correlatos. Identificou-se um crescimento lento e constante no depósito de patentes relacionados à área nos últimos 6 anos. O Brasil possui a maioria dos pedidos de patentes na área com 24 patentes depositadas, representando 41,4 % de todas as patentes depositadas analisadas. A análise comparando o número de documentos de patentes e seus códigos de classificação IPC demonstrou que 29,3 % dos documentos de patentes foram registrados na subclasse A61K 35/644 de preparações medicinais contendo material ou produtos compostos por cera de abelha, própolis, geleia real e mel. Através deste estudo foi possível comprovar que a atividade ainda demanda de muitos investimentos governamentais em pesquisa e desenvolvimento para que ela se consolide. Alguns países já iniciaram seu processo tecnológico na área e ao longo de algumas décadas será possível observar a consolidação da exploração comercial de meliponíneos a nível internacional.

Palavras-chave: Meliponini, Propriedade intelectual; Informação tecnológica

ABSTRACT

Pollen, honey and propolis from stingless bees, also called stingless beekeeping products, can be sold directly or as inputs for other goods with higher value. One way to identify strategic areas with industry and market potential is through the study and analysis of patent documents. Until this moment, no technological prospecting studies have been carried out to assess the world panorama and market trends for stingless beekeeping products. This work aimed to identify and characterize the potential markets and the technological evolution of stingless beekeeping products and related products through patent prospection study. Four internationally patent databases were consulted, Patentscope, Espacenet, LATIPAT, INPI. The analysis of the patent documents was carried out by classifying the documents by year of filing, country of origin, by the international patent classification code (IPC) and by the code of the Patent Cooperation Treaty (PCT). The search in the international patent databases returned a total of 58 filed patents in the last 20 years related to stingless beekeeping products. There has been a slow and steady growth in the filing of patents related to the area over the past 6 years. Brazil has most patent applications in the area with 24 filed patents, representing 41.4% of all deposited patents analyzed. The analysis comparing the number of patent documents and their IPC classification codes showed that 29.3% of patent documents were registered in subclass A61K 35/644 of medicinal preparations containing material or products composed of beeswax, propolis, royal jelly it's honey. Through this study it was possible to prove stingless beekeeping still requires a lot of government investments in research and development. Some countries have already started their technological process in the area and in a few decades, it will be possible to notice the consolidation of this economic activity in the international commerce.

Keywords: Meliponini, Intellectual property, Technological information

1 INTRODUÇÃO

As abelhas sem ferrão, também conhecidas como meliponíneos, são um grupo de insetos eussociais pertencentes a família Apidae, tribo Meliponini, que possuem o ferrão atrofiado (KERR; LELLO, 1962; MICHENER, 2007). Com mais de 500 espécies catalogadas até o presente momento, os meliponíneos possuem ampla distribuição na região tropical e subtropical da América, África, Ásia e Oceania (MICHENER, 2013).

Historicamente as abelhas sem ferrão foram utilizadas pelas populações autóctones desses continentes para diversas finalidades. O pólen, o mel, a própolis dos meliponíneos eram utilizadas na medicina tradicional, em rituais religiosos e na alimentação humana (CRANE, 1999; CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; QUEZADA-EUÁN *et al.*, 2018).

Nos dias atuais as abelhas sem ferrão ganharam destaque pelo potencial de mercado que seus produtos receberam nas últimas duas décadas. O pólen, o mel, a própolis das abelhas sem ferrão, também denominados produtos meliponícolas, podem ser comercializadas de forma direta ou como insumos para fabricação de outras mercadorias de maior valor agregado (HEARD; DOLLIN, 2000; BORGES, 2011; ALVES, 2013; ALVES; CARVALHO, 2018).

Os produtos meliponícolas possuem características únicas que podem variar de acordo com as diferenças existentes entre espécies de abelhas, a variabilidade na origem botânica/geográfica e ao clima de cada localidade (AL-HATAMLEH *et al.*, 2020). As singularidades existentes em cada produto meliponícola representam uma diversidade de compostos químicos bioativos com potenciais farmacológicos e nutricionais que podem ser explorados pela indústria para a produção de alimentos funcionais e de novos fármacos (RAO *et al.*, 2016; LAVINAS *et al.*, 2019).

Uma forma identificar as áreas estratégicas de tecnologias emergentes que possuem potencial industrial e de mercado para gerar maiores benefícios econômicos e sociais é através do estudo e análise de documentos de patentes (COELHO 2003; PORTER *et al.*, 2004).

Os documentos de patentes contêm informações jurídicas, econômicas e técnicas relevantes e os resultados advindos do seu processamento possibilitam a obtenção de informações de alto valor que embasam decisões críticas e inferências úteis como elementos-chave para a pesquisa e desenvolvimento, monitoramento tecnológico, estudos de mercado e estratégias de marketing (SUAREZ; ZAYAS; GUIADO, 2005; TORETI *et al.*, 2013).

Diversas são as pesquisas científicas que investigam o potencial desses produtos para as indústrias farmacêutica e de alimentos, porém até o presente momento não foram realizados estudos de prospecção tecnológica que avaliem o panorama mundial e as tendências de mercado

para estes produtos e seus correlatos. Diante desta problemática, este trabalho objetivou caracterizar a evolução tecnológica dos produtos meliponícolas e dos produtos correlacionados à meliponicultura por meio de um estudo prospectivo em bancos de dados de patentes.

2 METODOLOGIA

Para a busca foram consultados quatro banco de dados de escritórios de patentes reconhecidos internacionalmente. Os bancos de dados consultados foram *Patentscope*, banco de dados da Organização Mundial de Propriedade Intelectual (WIPO); *Espacenet*, banco de dados do Escritório Europeu de Patentes (EPO); Banco de dados de patentes publicadas por entidades da Espanha e América Latina (LATIPAT), vinculada ao Escritório Europeu de Patentes; Banco de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) do Brasil.

Foram utilizadas palavras chaves em língua inglesa, língua portuguesa e língua espanhola para filtrar os documentos nos bancos de dados. As palavras chaves utilizadas foram: “Abelhas sem ferrão”, “Mel”, “Pólen”, “Própolis”, “Geoprópolis”; “Stingless bees”, “Honey”, “Pollen”, “Propolis”, “Geopropolis”; “Abejas sin aguijon”, “Miel”, “Polen”, “Propóleo”, “Geopropóleo”. A busca limitou-se à presença das palavras-chave listadas nos títulos, na descrição e nos resumos dos documentos.

A coleta de dados foi realizada em outubro de 2020 e foi levado em consideração o intervalo de tempo de 2000 a 2020. Os escritórios de patentes de maneira geral publicam os pedidos de patentes 18 meses após a data do depósito. Ou seja, as patentes acessadas neste estudo foram depositadas entre o intervalo de tempo aproximado de junho de 1998 e abril de 2019.

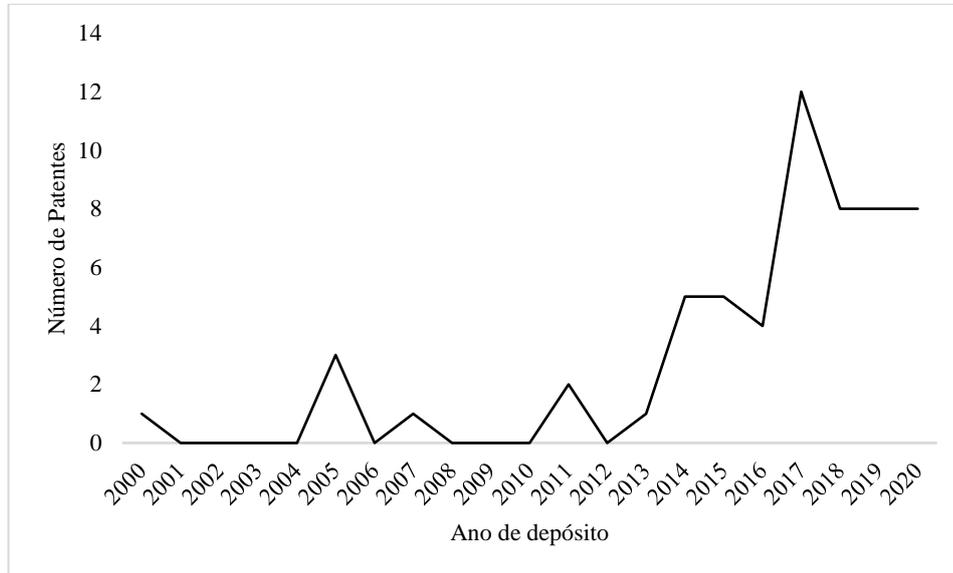
A análise dos documentos de patentes foi realizada separando os documentos por ano de depósito, país de origem, pelo código internacional de classificação de patentes (IPC) e quando houvesse, pelo código do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT). Os resultados obtidos foram expressos através de gráficos. As informações relevantes encontradas em cada documento foram extraídas e discutidas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na pesquisa nos bancos de dados internacionais de patentes foram encontradas 58 patentes publicadas nos últimos 20 anos relativas a produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura. Os resultados demonstraram que a primeira patente do período foi publicada

em 2000 e que o número de publicações de patentes na área atingiu um pico em 2017 com um total de 12 patentes publicadas (Figura 1).

Figura 1. Número de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura publicadas entre os anos de 2000 e 2020.



Fonte: Bancos de dados Patentscope, Espacenet, LATIPAT, INPI.

3.1 Panorama mundial de patentes relacionadas a meliponicultura e produtos meliponícolas nos últimos 20 anos

O número total de patentes relacionados a meliponíneos foi baixo quando comparado a estudos correlacionados aos produtos apícolas. Santos *et al.* (2019) obtiveram 533 retornos de patentes relacionadas a própolis de abelha *Apis mellifera* utilizadas em formulações destinadas à saúde animal entre os anos de 1992 e 2017. Toreti *et al.* (2013) encontraram 2884 patentes publicadas relacionadas à própolis de *A. mellifera* durante o período de 1971 a 2012.

Diferentemente da apicultura moderna, que é uma atividade econômica muito bem estabelecida em todo o planeta, a meliponicultura moderna apenas começou a se consolidar a partir dos anos 2000 (SILVA, 2014).

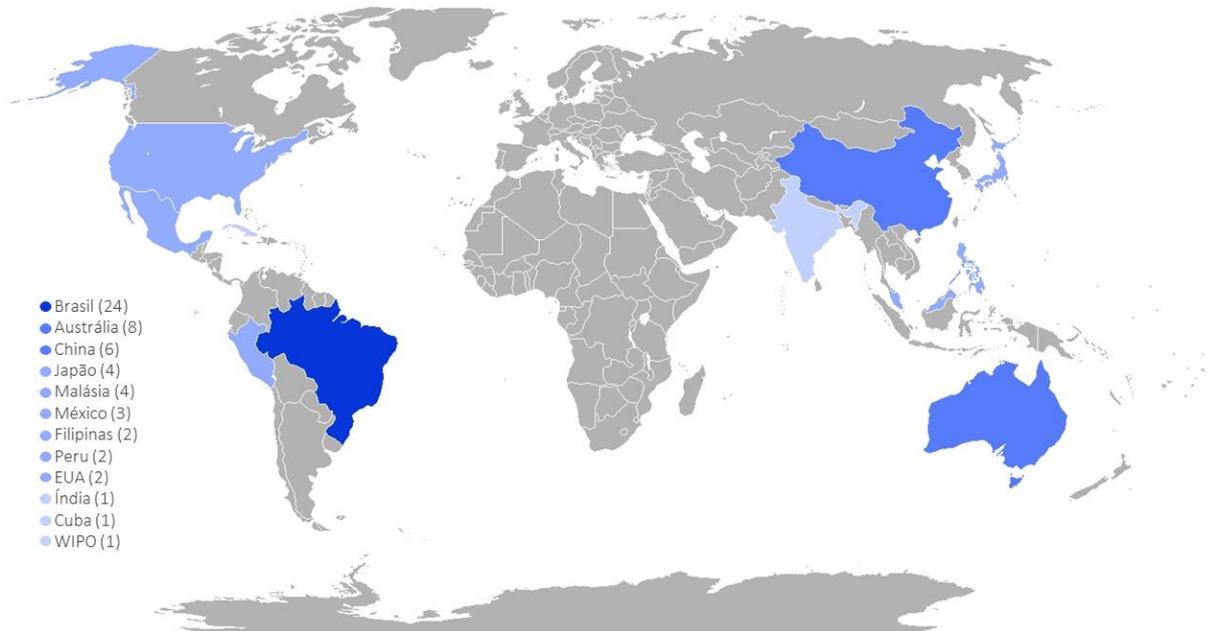
Foi possível identificar um crescimento lento, porém constante no depósito de patentes relacionados à produtos meliponícolas e correlacionados a meliponicultura sendo destacado um crescimento considerável nas publicações de patentes relacionadas na área nos últimos 6 anos. O número total de patentes encontrados neste estudo e o modo como os dados se projetam ao longo das duas décadas é um indicativo de que a exploração comercial dos produtos

meliponícolas e de produtos correlatos ainda dá os primeiros passos de sua expansão e consolidação como atividade econômica.

3.2 Países Produtores de patentes relacionadas à meliponicultura e produtos meliponícolas nos últimos 20 anos

O número de documentos de patentes classificados por país também foi avaliado (Figura 2). Os resultados demonstraram que o Brasil possui a maioria dos pedidos de patentes na área com 24 patentes depositadas, representando 41,4 % de todas as patentes depositadas analisadas.

Figura 2. Quantidade de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020, conforme o país de depósito.



Fonte: Bancos de dados *Patentscope*, *Espacenet*, *LATIPAT*, *INPI*. Foram avaliados o total de 58 documentos de patentes. EUA – Estados Unidos da América. WIPO – Organização Mundial de Propriedade Intelectual.

Um conjunto de fatores somados podem explicar o destaque do Brasil na publicação e no avanço tecnológico na área. O Brasil abriga uma grande diversidade de espécies de abelhas sem ferrão, com mais de 240 espécies já identificadas e provavelmente mais espécies a serem descobertas, sendo considerado o país mais biodiverso em espécies de meliponíneos do mundo (PEDRO, 2014).

Associado a isso, o Brasil vivenciou no início do século atual dois processos cruciais que possibilitam explicar seu destaque a nível mundial no seu desenvolvimento tecnológico na produção meliponícola. Foi aprovado no Brasil o processo de regulamentação da atividade de

meliponicultura e da utilização dos meliponíneos através da Resolução nº 346 pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (BRASIL, 2004a). Também no ano de 2004 foi sancionada a lei que instituiu a inovação tecnológica no Brasil (Lei de Inovação, 10.973 / 04). Depois de aprovada e de entrar em vigor no ano de 2005 essa lei proporcionou que os centros de pesquisa brasileiros criassem seus núcleos de inovação tecnológica e proporcionasse o início da aproximação entre universidades, centros de pesquisa e empresas para o desenvolvimento de novos produtos e para o avanço tecnológico nacional também com foco no aumento do número de pedidos de patentes. (BRASIL, 2004b; AMARANTE-SEGUNDO, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

Dentre outros países que vale mencionar a produção de patentes na área de produtos meliponícolas salienta-se a Austrália em segundo lugar com 13,8% das patentes publicadas entre 2000 a 2020 na área. A Austrália assim como o Brasil possui um percentual considerável de produtores meliponícolas, porém diferentemente do Brasil, a atividade de meliponicultura australiana é desenvolvida em sua maioria por hobistas que não objetivam criar essas abelhas em escala produtiva para fins comerciais (HALCROFT; SPOONER-HART; DOLLIN, 2013; HALCROFT; SPOONER-HART; HAIGH, 2013).

A china se destaca em terceiro lugar com 10,3 % das patentes publicadas na área. A china é reconhecidamente o maior exportador de produtos derivados de abelhas no mundo, porém a exploração comercial das abelhas sem ferrão em território chinês ainda está em um estágio muito inicial (ZHENG *et al.*, 2018).

Em 4º lugar estão o Japão e a Malásia que juntos detém 13,8 % das patentes na área. Salienta-se que o Japão foi o primeiro país a publicar uma patente na área de produtos meliponícolas nas últimas duas décadas. O pioneirismo japonês pode estar relacionado à ampla política de inovação implantada no país no século passado associada à demanda por produtos medicinais e alimentícios derivados de abelhas pela população japonesa. Um exemplo factível do interesse do mercado nipônico nos produtos derivados de abelhas é que o Japão chega a importar cerca de 80 % da própolis apícola que consome do mercado brasileiro (FREEMAN, 1995; KOHSAKA; PARK; TORETTI, 2013; UCHIYAMA, 2017).

A Malásia por sua vez é um país tropical que possui uma diversidade singular de abelhas sem ferrão. Embora suas leis de patentes e propriedade intelectual tenham sido promulgadas no final da década de 80, apenas em 2016 foi publicado no país o primeiro processo de patente relacionado às abelhas sem ferrão. A Malásia é um país em desenvolvimento que está começando através de iniciativas governamentais seu processo de desenvolvimento tecnológico na área de meliponicultura (HAMID *et al.*, 2016; RAMAIAH, 2018; ISMAIL *et al.*, 2018).

Através da análise dos dados também foi possível destacar a incidência de apenas um pedido de patente depositado na Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO) pelo mecanismo do Tratado de Cooperação de Patentes (PCT). O PCT faz parte do sistema internacional de patentes e ajuda os requerentes a obter proteção internacional para suas invenções. O baixo número de pedidos de PCT é um indicativo de que o processo de internacionalização do comércio de produtos meliponícolas não se desenvolveu plenamente e está limitado a fronteiras regionais (SANTOS *et al.*, 2019; WIPO, 2020).

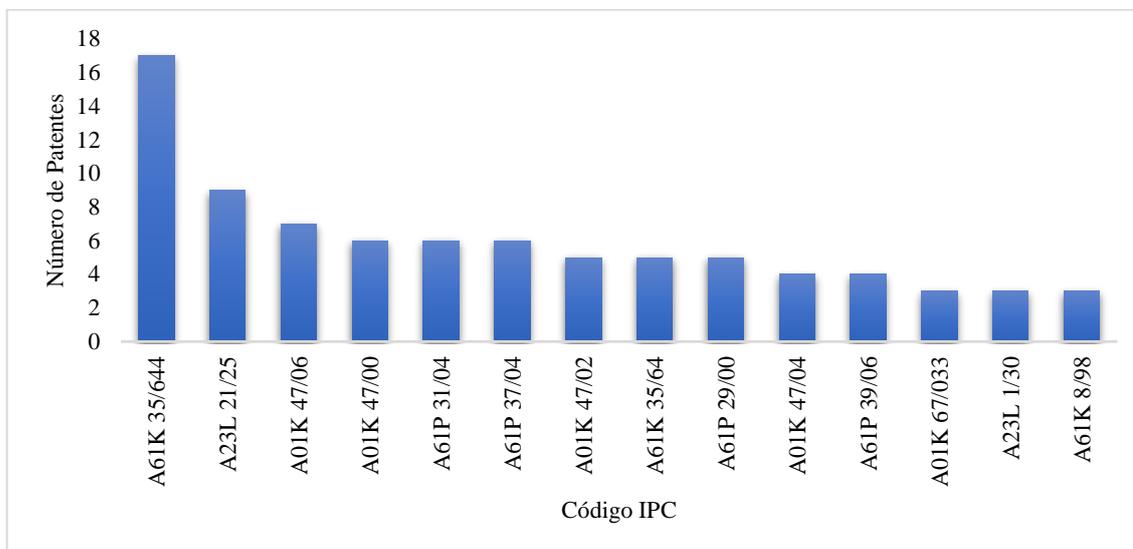
A Figura 2 é um reflexo de como se organizam os mercados consumidores de produtos meliponícolas no mundo. Ainda que exista uma demanda seletiva para esse nicho de mercado, já é possível notar quais países estão à procura de produzir e comercializar produtos meliponícolas. O Brasil e Austrália são países de destaque internacional na área de meliponicultura enquanto a China se destaca na produção em larga escala de derivados de abelhas (ALVES, 2013; HALCROFT; SPOONER-HART; HAIGH, 2013; ZHENG *et al.*, 2018). Juntos esses três países representam 65,5% da publicação mundial de patentes na área de meliponicultura e produtos meliponícolas. O volume de patentes publicadas nesses países pode ser um indicador do interesse na produção e comercialização destes produtos em escalas maiores.

3.3 Panorama de Patentes de acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC)

O método de classificação internacional de patentes (IPC) é um importante padrão de classificação internacional das funcionalidades e áreas de cada patente. Através de uma análise crítica é possível identificar quais as principais tendências tecnológicas que estão sendo seguidas em determinada área (INPI, 2020).

A análise comparando o número de documentos de patentes e seus códigos de classificação IPC mostrou que quase um terço (29,3 %) dos documentos de patentes foram registrados na subclasse A61K 35/644, esta subclasse agrupa preparações medicinais contendo material ou produtos compostos por cera de abelha, própolis, geleia real e mel (Figura 3).

Figura 3. Códigos IPC mais citados em patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020.



Nota: Códigos de classificação correspondem a: A61K 35/644 - Preparações medicinais contendo cera de abelha, própolis, geleia real ou mel; A23L 21/25 – Mel, Substitutos do mel; A01K 47/06 - Outros detalhes de colmeias; A01K 47/00 – Colmeias; A61P 31/04 - Agentes antibacterianos; A61P 37/04 - Fármacos imunostimulantes para o tratamento de distúrbios imunológicos ou alérgicos; A01K 47/02 - Construção ou arranjo de estruturas para favos de mel; A61K 35/64 - Preparações medicinais contendo materiais de insetos; A61P 29/00 - Agentes analgésicos não-centrais, antipiréticos ou anti-inflamatórios; A01K 47/04 - Favos de Mel Artificiais; A61P 39/06 - Agentes captadores de radicais livres ou antioxidantes; A01K 67/033 - Criação ou reprodução de invertebrados A23L 1/30 - Alimentos ou Bebidas não alcoólicas enriquecidos; A61K 8/98 - Cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal de origem animal.

A diversidade de compostos químicos presentes nos produtos meliponícolas é um ponto favorável para sua utilização como insumos em formulações medicinais destinadas à saúde humana e animal. Wang *et al.* (2019) desenvolveram um método de isolamento de polifenóis derivados de méis de meliponíneos destinados à prevenção e tratamento de doenças inflamatórias. Segundo os autores é viável e possível a aplicação desse método de extração para produção de medicamentos.

Em segundo lugar destaca-se a subclasse A23L 21/25 que representou 15,5 % das patentes publicadas no período estabelecido, esta subclasse especifica alimentos ou bebidas não alcoólicas que envolvem mel e substitutos do mel como produto ou insumo. A porcentagem de patentes registradas na área é um indicativo da tendência crescente do consumo de méis de abelhas sem ferrão que vem se estabelecendo no mundo nas últimas duas décadas. O mercado de consumidores de mel está se tornando mais seletivo e demanda características sensoriais mais rebuscadas do produto. Graças às suas características sensoriais singulares o mel dos meliponíneos tem um apelo muito forte na preferência do consumidor (ALVES, 2013).

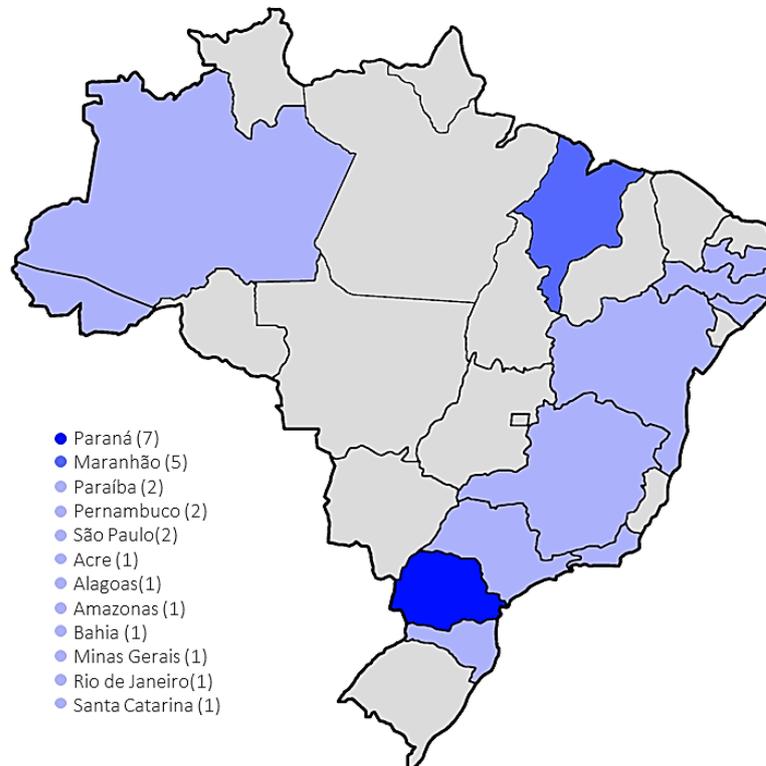
Na terceira colocação destaca-se o código A01K 47/06 (12%) que especifica configurações de colmeias. Um entrave na produção meliponícola é a falta da existência de um

padrão universal de colmeias e ferramentas para criação racional de meliponíneos. A falta de padronização acaba impossibilitando o manejo e a produção meliponícola em maiores escalas. A produção de patentes na área é um indicativo de que o estabelecimento de padrões sólidos para a atividade irá ocorrer nas próximas décadas e por consequência ajudará a consolidar e ampliar a produção de derivados da meliponicultura (CORTOPASSI-LAURINO *et al.*, 2006; JAFFÉ *et al.*, 2015).

3.4 Cenário Brasileiro de Depósito de Patentes Relacionadas à Produtos Meliponícolas nos Últimos 20 anos

O Brasil se destacou nos últimos 20 anos como o país com o maior número de depósitos de patentes de produtos meliponícolas e produtos correlacionados à meliponicultura acumulando o total de 41,4 % de todas as patentes depositadas. Porém, há uma estratificação desse desenvolvimento tecnológico dentro do território brasileiro (Figura 4). O estado brasileiro de destaque no depósito de patentes foi o Paraná que sozinho possui 29,1 % de todas as patentes depositadas na área. o Paraná é atualmente o estado brasileiro que mais produz e exporta produtos derivados de abelhas (IBGE, 2020; SEAB, 2020). O avanço científico e tecnológico na área de apicultura proporcionados pela parceria existente entre os centros de pesquisa, o setor privado e às iniciativas governamentais consolidaram o Paraná como estado de referência brasileira na coleta, beneficiamento e exportação de produtos derivados de abelhas (NUNES; HEINDRICKSON, 2019).

Figura 4. Quantidade de patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020 no Brasil conforme a unidade federativa de depósito.



Fonte: Bancos de dados *Patentscope*, *Espacenet*, *LATIPAT*, *INPI*. Foram avaliados o total de 24 documentos de patentes.

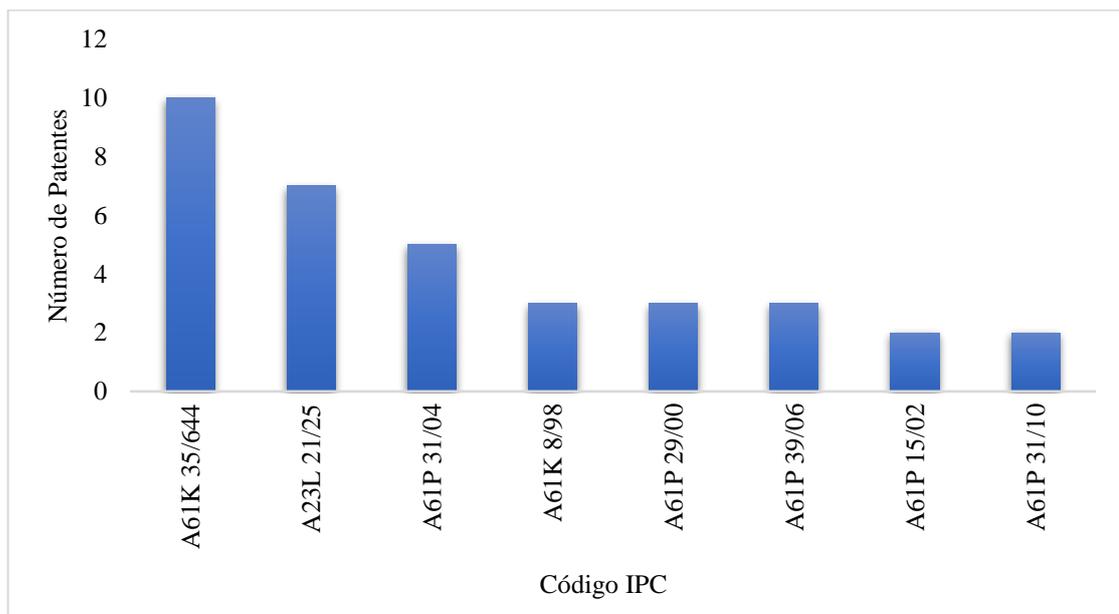
Em segundo lugar destaca-se o estado do Maranhão, que apresentou 20,8 % das patentes depositadas no Brasil. No Maranhão a iniciativa de projetos de apoio e aproximação entre centros de pesquisa e criadores de abelhas sem ferrão proporcionou o avanço científico e tecnológico na área da meliponicultura que se refletiu no maior número de patentes depositadas na última década (ALVES, 2013; GOSTINSKI, 2018). A grande variedade de biomas e de espécies de abelhas sem ferrão no território maranhense somados ao número crescente de patentes publicadas na área são um indicativo de que o estado tem potencial para a produção meliponícola e que nas próximas décadas a comercialização de produtos e insumos derivados da meliponicultura poderão se consolidar como uma importante atividade econômica do estado (ARAÚJO *et al.*, 2016).

Outras unidades da federação apresentaram valores menos expressivos de publicações de pedidos de patentes, outro dado relevante é que 60 % das unidades federativas brasileiras não apresentaram nenhuma publicação referente a meliponicultura nos bancos de dados nas últimas duas décadas. A disparidade existente entre o avanço tecnológico da área nos estados brasileiros é um indicativo de que o desenvolvimento da meliponicultura não ocorre de modo

igualitário em todo o território nacional e que são necessários incentivos e políticas governamentais a nível nacional para que a atividade se consolide em todo o território nacional (VENTURIERI *et al.*, 2012).

A análise dos códigos de classificação IPC de patentes depositadas no Brasil revelou que 41,6 % dos documentos de patentes brasileiros foram registrados na subclasse A61K 35/644 (Figura 5). Seguindo a tendência observada no mundo, a maioria das patentes relacionadas às abelhas sem ferrão no território brasileiro buscou estabelecer o potencial farmacêutico dos produtos meliponícolas. Batista *et al.* (2017) desenvolveu uma formulação farmacêutica a partir do extrato da geoprópolis da abelha sem ferrão *Melipona fasciculata* com atividade anti-helmíntica comprovada contra parasitas gastrointestinais de pequenos ruminantes.

Figura 5. Códigos IPC mais citados em patentes de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020 no Brasil.



Nota: Códigos de classificação correspondem a: A61K 35/644 - Preparações medicinais contendo cera de abelha, própolis, geleia real ou mel; A23L 21/25 – Mel, Substitutos do mel; A61P 31/04 - Agentes antibacterianos; A61K 8/98 - Cosméticos ou preparações similares para higiene pessoal de origem animal; A61P 29/00 - Agentes analgésicos não-centrais, antipiréticos ou anti-inflamatórios; A61P 39/06 - Agentes captadores de radicais livres ou antioxidantes; A61P 15/02 - Fármacos para o tratamento de doenças vaginais; A61P 31/10 – Agentes antimicóticos.

A subclasse A23L 21/25 que identifica produtos derivados de Mel alcançou o segundo lugar com 29,1 % das patentes publicadas na área em território brasileiro. A tendência de consumo do mel das abelhas sem ferrão se mostra similar no Brasil ao resto do mundo e é crescente o emprego de tecnologias que valorizam o mel das abelhas sem ferrão como produto ou como insumo de mercadorias de alto valor agregado. Machado *et al.* (2019) utilizou

exitosamente o mel de *Melipona scutellaris* como insumo para a produção de um iogurte caprino probiótico. A presença dos compostos bioativos no mel proporcionou a melhoria das características funcionais e sensoriais do produto.

3.4.1 Espécies de abelhas sem ferrão brasileiras envolvidas em processos de patentes

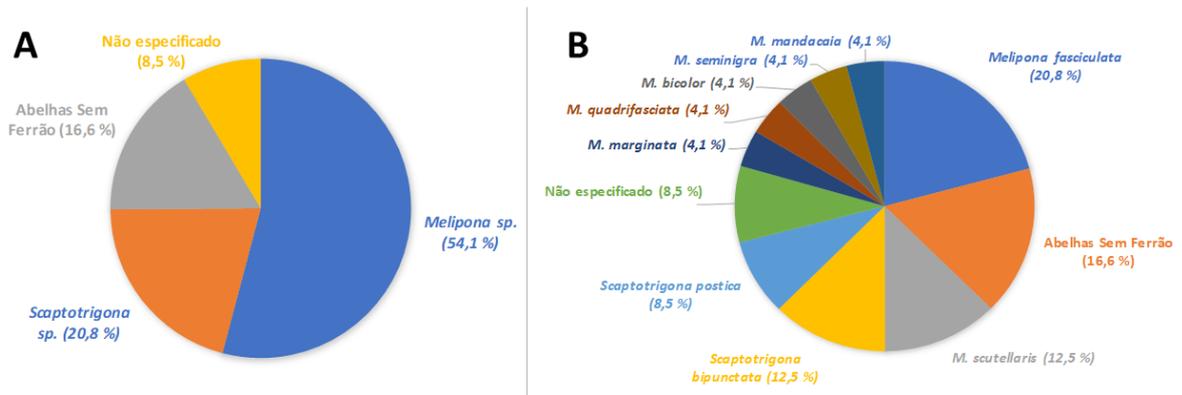
O Brasil é um país biodiverso de abelhas sem ferrão, porém poucas espécies são utilizadas na meliponicultura da contemporaneidade. Na Figura 6 observa-se a porcentagem das espécies de meliponíneos brasileiros envolvidos em processos de patentes. A partir da Figura 6A foi possível constatar que mais da metade (54,1 %) das espécies de abelhas sem ferrão brasileiras envolvidas em processos de patentes são pertencentes ao gênero *Melipona* sp. Dentre as abelhas sem ferrão, o gênero *Melipona* compreende o de maior número em espécies no Brasil, destacando-se pela grande riqueza em biodiversidade (ZANELLA; MARTINS, 2003; CARVALHO; ZANELLA, 2017). Entre centenas de espécies de abelhas nativas existentes no Brasil, a maioria produz mel apenas para satisfazer as necessidades nutricionais da colônia. Somente algumas espécies são excelentes produtoras de mel, como o gênero *Melipona*, com espécies de grande potencial meliponícola e amplamente criadas. (ALVES, 2013).

Em segundo lugar destacou-se o gênero *Scaptotrigona* sp. com 20,8% das patentes depositadas no Brasil. A porcentagem de patentes na área pode ser reflexo da importância desse grupo de abelhas no Brasil. De acordo com Martínez-Fortún *et al.*, (2018) as abelhas do gênero *Scaptotrigona* são adaptáveis ao manejo, são resistentes a pragas e sobrevivem com êxito em ambientes alterados pelo homem. Além disso, essas abelhas armazenam grandes quantidades de mel, pólen e própolis que possuem alto valor de mercado e podem ser comercializados.

Também foi possível observar a partir dos resultados obtidos que 16,6 % dos depositantes não identificaram qual as espécies de abelhas sem ferrão envolvidas em seus processos de patente e citaram apenas os termos “Abelhas sem ferrão” e/ou “Meliponíneos” em seu texto (Figura 6). Possivelmente nesses casos foram desenvolvidas tecnologias generalistas de possível aplicação em muitas espécies do grupo. Uma das dificuldades encontradas no processo de consolidação da meliponicultura como uma atividade econômica é a falta de padronização existente na atividade devido a singularidade de espécies de cada região brasileira (JAFFÉ *et al.*, 2015). A criação de tecnologias universais que permitam sua aplicação em diversas espécies de abelhas utilizadas na meliponicultura são um importante passo para a

consolidação da atividade no Brasil por possibilitarem a produção dos produtos meliponícolas em escalas maiores e de forma mais eficiente.

Figura 6. Abelhas sem ferrão envolvidas em processos de patentes brasileiras de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020.



(A) Por gênero. (B) Por espécie.

Nota: Abelhas sem ferrão envolvidas em processos de patentes brasileiras de produtos meliponícolas e correlacionados à meliponicultura depositadas entre 2000 e 2020. Fonte: Kewen Santiago

3.4.2 O Nordeste e o semiárido brasileiro no contexto da inovação tecnológica dos produtos meliponícolas

O nordeste brasileiro foi responsável por 45,8 % das publicações de patentes na área de produtos meliponícolas e correlacionados a meliponicultura no período de 2000 a 2020 (Figura 4). O nordeste brasileiro é tradicionalmente conhecido como o maior produtor de mel nativo com destaque aos estados do Maranhão, Bahia, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Piauí. Os investimentos do governo e da iniciativa privada fomentam estudos e projetos que ampliam o número de espécies e a produção de mel (ALVES, 2013).

Porém a maioria das patentes depositadas na área envolvem espécies de abelhas de zonas tropicais e subtropicais úmidas do nordeste brasileiro, a região semiárida que compreende a maior extensão territorial nordestina apresentou apenas uma patente depositada com espécies nativas da região semiárida.

Este dado é um indicativo de que a região semiárida do nordeste brasileiro ainda demonstra ser um campo inexplorado tecnologicamente na área fazendo-se necessário mais incentivos governamentais para impulsionar o desenvolvimento regional.

O Estado do Rio Grande do Norte, estado de destaque pela sua grande quantidade de meliponicultores na região semiárida, não possui nenhuma patente na área, mesmo sendo

possuidor de diversas espécies amplamente criadas na região (CARVALHO; ZANELLA, 2017).

A meliponicultura contribui com a renda de muitos produtores rurais do estado do Rio Grande do Norte (KOFFLER *et al.*, 2015). A ausência de depósito de patentes na área de produtos meliponícolas neste estado indicam falta de integração entre a produção meliponícola estadual e os centros de pesquisa da região. São necessárias políticas de incentivo que propiciem a integração entre os produtores e os centros de tecnologia para que o desenvolvimento tecnológico desta atividade se consolide.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A meliponicultura moderna é uma atividade econômica recente e está passando atualmente pelo seu processo de consolidação e modernização. Através deste estudo foi possível comprovar de que a atividade tem potencial econômico relevante, mas ainda demanda de muitos investimentos governamentais em pesquisa e desenvolvimento para que ela se consolide como uma atividade econômica bem conhecida e disseminada pelo mundo. Alguns países já iniciaram seu processo tecnológico na área e ao longo de algumas décadas será possível observar a consolidação da exploração comercial de meliponíneos a nível internacional.

REFERÊNCIAS

- AL-HATAMLEH, M.; BOER, J. C.; WILSON, K. L.; PLEBANSKI, M.; MOHAMUD, R.; MUSTAFA, M. Z. Antioxidant-Based Medicinal Properties of Stingless Bee Products: Recent Progress and Future Directions. **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 923, 2020.
- ALVES, R. M. O. **Production and Marketing of Pot-Honey**. In: Vit P., Pedro S.R., Roubik D., editors. *Pot-Honey*. Springer; New York, NY, USA, pp. 541–556, 2013.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L. Pot-Pollen ‘Samburá’ Marketing in Brazil and Suggested Legislation. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Eds.). **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Springer International Publishing, p. 435–443, 2018.
- AMARANTE-SEGUNDO, G. A. O papel dos núcleos de inovação tecnológicas na gestão da política de inovação e sua relação com as empresas. **Marco regulatório em ciência, tecnologia e inovação: texto e contexto da Lei nº 13.243/2016**. Organizado por: Fabiana de Menezes Soares, Esther Kulkamp Eyng Prete. Belo Horizonte: Arraes Editores, 220 p., 2018.

ARAÚJO, L. S.; SILVA, G. B. S.; TORRESAN, F. E.; VICTORIA, D. C.; VICENTE, L. E.; BOLFE, E. L.; MANZATTO, C. V. **Conservação da biodiversidade do estado do Maranhão: cenário atual em dados geoespaciais**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 29p., 2016.

BATISTA, M. C. A.; RIBEIRO, M. N. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M. **Formulação farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis**. Titular: Universidade Federal do Maranhão. BR102016002463A2. Depósito: 04 fev. 2016. Concessão: 08 ago. 2017. <<https://www.bionorte.org.br/bionorte/ppg-numeros-producao.html?idp=23736>> acesso em Março de 2021.

BATISTA, M. C. A.; RIBEIRO, M. N. S.; COSTA-JÚNIOR, L. M. **Formulação farmacêutica anti-helmíntica com o extrato seco da geoprópolis**. Titular: Universidade Federal do Maranhão. BR102016002463A2. Depósito: 04 fev. 2016. Concessão: 08 ago. 2017.

BORGES, L. C. M. **Os termos da meliponicultura: uma abordagem socioterminológica**. 2011. 197f. Dissertação (Mestrado em Letras) – Instituto de Letras e Comunicação, Universidade Federal do Pará. Belém, 197f., 2011.

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

BRASIL. Subchefia para Assuntos Jurídicos. **Dispõe sobre incentivos à inovação e à pesquisa científica e tecnológica no ambiente produtivo e dá outras providências**. Lei nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004.

CARVALHO, A. T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro**. Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 41-72, 2017.

CLASSIFICAÇÃO DE PATENTES. **Instituto Nacional de Propriedade Industrial**, Rio de Janeiro, 17 de março de 2020. Disponível em: <<http://antigo.inpi.gov.br/menu-servicos/patente/classificacao-de-patentes#:~:text=A%20IPC%20%C3%A9%20o%20sistema,atrav%C3%A9s%20de%20um%20sistema%20hier%C3%A1rquico>> Acesso em: 22 de outubro de 2020.

COELHO, G. M. **Prospecção tecnológica: metodologias e experiências nacionais e internacionais**. Projeto CTPetro Tendências Tecnológicas: Nota Técnica 14. Instituto Nacional de Tecnologia 2003. <<http://www.tendencias.int.gov.br/arquivos/textos/NT14.zip>> acesso em março de 2021.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. W.; DOLLIN, A.; HEARD, T.; AGUILAR, I.; VENTURIERI, G. C.; EARDLEY, C.; NOGUEIRA-NETO, P. Global meliponiculture: challenges and opportunities. **Apidologie**, Springer Verlag, v. 37, n. 2, pp. 275-292, 2006.

CRANE, E. **The World History of Beekeeping and Honey Hunting**. Duckworth; London, UK. 682 p., 1999.

DUTRA, R. P.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S **Processo de obtenção, formulação de extratos padronizados, fração e substâncias isoladas da geoprópolis brasileira de abelha sem ferrão e seu uso como agente leishmanicida.** Titular: Universidade Federal do Maranhão. BR n. P11103291-0. Depósito: 05 jul. 2011. Concessão: 27 ago. 2018. <
<https://busca.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController?Action=detail&CodPedido=870423&SearchParameter=PROCESSO%20DE%20OBTEN%C7%C3O,%20FORMULA%C7%C3O%20DE%20EXTRATOS%20PADRONIZADOS,%20FRA%C7%C3O%20E%20SUBST%C2NCIAS%20ISOLADAS%20DA%20GEOPR%20D3POLIS%20BRASILEIRA%20DE%20ABELHA%20SEM%20FERR%C3O%20E%20SEU%20USO%20COMO%20AGENTE%20LEISHMANICIDA%20%20%20%20%20%20%20&Resumo=&Titulo=>> acesso em Março de 2021.

FREEMAN, C. The ‘National System of Innovation’ in historical perspective. **Cambridge Journal of Economics**, v. 19, n. 1, p. 5–24, 1995.

GOSTINSKI, L. F. **Recursos alimentares e forrageamento de duas espécies de abelhas sem ferrão - *Melipona (Melikerria) fasciculata* Smith, 1854 e *Melipona flavolineata* Friese, 1900 (Apidae, Meliponini) - na região da Baixada Maranhense, Brasil. 2018.** 130 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 130 f., 2018.

HALCROFT, M. T.; SPOONER-HART, R.; HAIGH, A. M.; HEARD, T. A.; DOLLIN, A. The Australian stingless bee industry: a follow-up survey, one decade on. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 2, p. 1–7, 2013.

HALCROFT, M.; SPOONER-HART, R.; DOLLIN, L. A. **Australian Stingless Bees.** In: VIT, P.; PEDRO, S.; ROUBIK, D. (eds) *Pot-Honey*. Springer, New York, NY, 2013.

HAMID, S. A.; SALLEH, M. S.; THEVAN, K.; HASHIM, N. A. Distribution and Morphometrical Variations of Stingless Bees (Apidae : Meliponini) In Urban and Forest Areas of Penang Island, Malaysia. **Journal of Tropical Resources and Sustainable Science**, v. 4, p. 1–5, 2016.

HEARD, T.; DOLLIN, A. Stingless bee keeping in Australia: snapshot of an infant industry. **Bee World**, v. 81, p. 116–125, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal – Diversos anos.** Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 out. 2020.

ISMAIL, M. M.; IRYANI, W.; ISMAIL, W. Development of stingless beekeeping projects in Malaysia. **E3S Web of Conferences**, v. 52, n. 28, p. 1–5, 2018.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A. T.; MAIA, U. M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C. A. L.; CARVALHO-ZILSE, G. A.; FREITAS, B. M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. F.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. 130-111, 2015.

KERR, W. E.; LELLO, E. Sting Glands in Stingless Bees: A Vestigial Character (Hymenoptera: Apidae). **Journal of the New York Entomological Society**, v. 70, p. 190–214, 1962.

KOHSAKA, R.; PARK, M. S.; UCHIYAMA, Y. Beekeeping and honey production in Japan and South Korea: past and present. **Journal of Ethnic Foods**, v. 4, n. 2, p. 72–79, 2017.

LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B. C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; RODRIGUES, I. A. Brazilian stingless bee propolis and geopropolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389–399, 2019.

MACHADO, T. A. D. G.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G.; PINTADO, M. M. E. **Iogurte caprino probiótico adicionado de mel de abelha *Melipona scutellaris***. Titular: Universidade Federal da Paraíba. BR102017023994A2. Depósito: 08 nov. 2017. Concessão: 04 jul. 2019.

MARTÍNEZ-FORTÚN, S.; RUIZ, C.; QUIJANO, N. A.; VIT, P. **Rural-Urban Meliponiculture and Ecosystems in Neotropical Areas. *Scaptotrigona*, a Resilient Stingless Bee? BT-Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. In: VIT, Patricia; PEDRO, Silvia R M; ROUBIK, David W (Orgs.). Cham: Springer International Publishing, p. 421–434, 2018.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Baltimore, Maryland. **The Johns Hopkins University Press**, 2ed., 953 p., 2007.

MICHENER, C. D. **The meliponini**. In: VIT, P.; PEDRO, S. R.; ROUBIK, D., editors. Pot-Honey. Springer; New York, NY, USA, pp. 3–17, 2013.

NUNES, S. P.; HEINDRICKSON, M. The honey production chain in Brazil: analysis from southwest Paranaense. **Brazilian Journal of Development**, p. 16950–16967, 2019.

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

PORTER, A. L.; ASHTON, B.; CLAR, G.; COATES, J. F.; CUHLS, K.; CUNNINGHAM, S. W.; DUCATEL, K.; DUIN, P.; GEORGEHIU, L.; GORDON, T.; LINSTONE, H.; MARCHAU, V.; MASSARI, G.; MILES, I.; MOGEE, M.; SALO, A.; SCAPOLLO, F.; SMITS, R.; THISSEN, W. Technology futures analysis: towards integration of the field and new methods. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 71, n. 3, p. 287–303, 2004.

QUEZADA-EUÁN, J.; NATES-PARRA, G.; MAUÉS, M. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. Economic and cultural value of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 534–557, 2018.

RAMAIAH, A. K. INNOVATION, INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS AND COMPETITION LAW IN MALAYSIA. **South East Asia Journal of Contemporary Business, Economics and Law**, v. 14, n. 4, 2018.

RAO, P. V.; KRISHNAN, K. T.; SALLEH, N.; GAN, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 657-664, 2016.

SANTOS, L. M.; FONSECA, M. S.; SOKOLONSKI, A. R.; DEEGAN, K. R.; ARAÚJO, R. P.; UMSZA-GUEZ, M. A.; BARBOSA, J. D.; PORTELA, R. D.; MACHADO, B. A. Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting. **Journal of Science of Food And Agriculture**, v. 15, ed. 100, n. 4, p. 1369-1382, 2020.

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DO PARANÁ – SEAB. **Paraná se destaca como líder nacional nas exportações de mel**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/Noticia/Parana-se-destaca-como-lider-nacional-nas-exportacoes-de-mel#>. Acesso em: 23 de out. 2020.

SILVA, L. Por uma leitura sociotécnica da história da criação de abelhas no Brasil: análise à luz da Social. **Construction of Technology**. Mosaico Social, v. 12, p. 143-159, 2014.

SUAREZ, D.; ZAYAS, D.; GUIADO, F. Propolis: Patents and Technology Trends for Health Applications. **Journal of Business Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 119-125, 2005.

TORETI, V. C.; SATO, H. H.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2013, p. 697-390, 2013.

VENTURIERI, G.; ALVES, D. A.; VILLAS-BÔAS, J. K.; CARVALHO, C. A. L.; MENEZES, C.; VOLLET NETO, A.; CONTRERA, F.; CORTOPASSI-LAURINO, M.; NOGUEIRA-NETO, P.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Meliponicultura no Brasil: Situação Atual e Perspectivas Futuras para o Uso na Polinização Agrícola**. 2012. In book: Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. Publisher: EDUSP Editors: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; CANHOS, D. A. C.; ALVES, D. A.; SARAIVA, A. M., 2012.

WANG, K.; LIANG, X.; WANG, L.; WU, L.; XUE, X. **Extraction for polyphenols from honey made by stingless bees and applications of extract in immunoregulation**. Titulares: Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Depósito: 15 ago. 2017. Concessão: 26 nov. 2019. <> acesso em Março de 2021.

WIPO. WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION. Protecting your **Inventions Abroad: Frequently Asked Questions About the Patent Cooperation Treaty (PCT)**. Disponível em: < <https://www.wipo.int/pct/en/faqs/faqs.html> >. Acesso em: 20 de outubro de 2020.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. **Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da caatinga, Editora Universitária da UFPE, Recife, Brasil, p. 75-134, 2003.

ZHENG H.; CAO, L.; HUANG, S.; NEUMANN, P.; HU, F. (2018) **Current Status of the Beekeeping Industry in China**. In: CHANTAWANNAKUL, P.; WILLIAMS, G.; NEUMANN, P. (eds) Asian Beekeeping in the 21st Century. Springer, Singapore, p. 129-158, 2018.

CAPÍTULO III
A GEOPRÓPOLIS DA ABELHA JANDAÍRA

RESUMO

O presente estudo objetivou caracterizar a geoprópolis *in natura* e os extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* (abelha jandaíra). O trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa foram coletadas e caracterizadas amostras de geoprópolis *in natura*. A segunda etapa consistiu em desenvolver e caracterizar um processo de extração de componentes bioativos das amostras *in natura*, identificando as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos extratos produzidos além do potencial bioativo como conservante natural de alimentos. Foi possível identificar que o teor de matéria mineral nas amostras de geoprópolis *in natura* variou de 37,5 a 82,0 g/100 g e influenciou significativamente na qualidade e quantidade de compostos bioativos presentes nos extratos. Também foi possível identificar alta carga microbiana de bactérias mesófilas, coliformes totais e bolores e leveduras na geoprópolis *in natura*, porém, contagens de microrganismos abaixo do limite de detecção foram encontradas nos extratos. Em relação à composição físico-química dos extratos foi possível observar variações de pH entre 4,15 a 5,9, densidade entre 0,796 a 0,859 g/cm³, teor de resíduo seco entre 1,0 a 17,9 g/100 ml, teor de compostos fenólicos totais variando de 3,2 a 41,7 mg EAQ/g e de flavonoides entre 1,2 a 49,0 mg EQ/g. Os valores da CE₅₀ da atividade antioxidante variaram entre 0,16 a 4,16 µg/ml. Observou-se que houve correlação forte e positiva entre o teor de cinzas das amostras de geoprópolis bruta e a CE₅₀ (rs = 0,728). Também se constatou correlação forte e negativa entre a CE₅₀ e as variáveis resíduo seco (rs = -0,955) compostos fenólicos totais (rs = -0,960) e flavonoides totais (rs = 0,925). Em relação a atividade antimicrobiana dos extratos foi possível identificar maiores valores de inibição frente a microrganismos gram-positivos quando comparado às cepas gram-negativas, porém a maioria dos extratos conseguiram inibir total ou parcialmente o crescimento microbiano. Quanto as características sensoriais, tanto a geoprópolis *in natura* quanto os extratos hidroetanólicos de geoprópolis mostraram características sensoriais diversas. A cor marrom, o aroma balsâmico e a consistência rígida foram as características sensoriais predominantes da geoprópolis *in natura*. A tonalidade âmbar, o aroma balsâmico predominaram nos extratos, já os sabores variaram do amargo ao picante forte e balsâmico. Nesse estudo foi possível constatar que a geoprópolis de *Melipona subnitida* poderia funcionar como um conservante natural de alimentos devido à sua capacidade de inibir a oxidação e controlar total ou parcialmente o crescimento da flora microbiana contaminante de alimentos. A contaminação microbiana e o alto teor de cinzas encontrados na geoprópolis *in natura* podem servir como uma ferramenta para medir a qualidade físico-química e microbiológica do produto além de servir como uma ferramenta de avaliação das condições higiênico-sanitárias da colmeia. O baixo índice de contaminação microbiana encontrado nos extratos indicaram a segurança sanitária da técnica de extração utilizada para a produção e uso dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis de abelha jandaíra.

Palavras-chave: Meliponíneos, Bioativos naturais; Conservação de alimentos

ABSTRACT

The present study aimed to characterize the geopropolis and the ethanolic extracts of the jandaíra bee. The research was divided into two stages. In the first one, fresh geopropolis samples were collected and characterized. In the second stage there was developed and characterized a process for the extraction of bioactive components from the fresh samples. The physical-chemical, microbiological and sensory properties of the extracts produced and the bioactive potential as a natural food preservative were evaluated. The results obtained in this research identified high mineral contents in the fresh geoprópolis, this significantly influenced the quality and quantity of bioactive compounds present in the extracts. High microbial load of mesophilic bacteria, total coliforms and molds and yeasts was identified in the fresh geoprópolis. However, extremely low counts of microorganisms were found in the extracts. About the physical-chemical composition of the geoprópolis extracts, it was possible to observe pH variations between 4.15 to 5.9, density between 0.796 to 0.859 g/cm³, dry residue content between 1.0 to 17.9 g/100 ml, content of total phenolic compounds ranging from 3.2 to 41.7 mg GAE/g and flavonoids between 1.2 to 49.0 mg QE/ g. The IC₅₀ values of the antioxidant activity ranged from 0.16 to 4.16 µg / ml. It was observed that there was a strong and positive correlation between the ash content of the crude geopropolis samples and the IC₅₀ (rs = 0.728). There was also a strong and negative correlation between the IC₅₀ and the variables dry residue (rs = -0.955) total phenolic compounds (rs = -0.960) and total flavonoids (rs = 0.925). Regarding the antimicrobial activity of the extracts, it was possible to identify higher values of inhibition against gram-positive microorganisms when compared to gram-negative strains, however most of the extracts were able to inhibit microbial growth. About the sensory characteristics, both the fresh geopropolis and the hydroethanolic extracts showed different sensory characteristics. The brown color, the balsamic aroma and the rigid consistency were the predominant sensory characteristics of the fresh geopropolis. The amber color tones and the balsamic aroma prevailed in the extracts, while the flavors ranged from bitter to strong and spicy balsamic. In this study it was possible to verify that the jandaíra geopropolis could be a natural food preservative due to its ability to inhibit oxidation and to control the growth of foodborne microorganisms. The microbial contamination and the high ash content found in the geopropolis in natura can serve as a tool to measure the physical-chemical and microbiological quality of the product also could serve as a tool to evaluate the hygienic conditions of the hive. The low rate of microbial contamination found in the extracts indicated the safety of the extraction technique.

Keywords: Meliponines; Natural bioactives; Food preservation

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais se consolidou ao longo da história das civilizações humanas. No período da antiguidade, a humanidade já utilizava produtos naturais no combate a doenças, na conservação de alimentos e em rituais religiosos e culturais (BILLING; SHERMAN, 1998; FABRICANT; FARNSWORTH, 2001; QUEZADA-EUÁN *et al.*, 2018; BROMHAM *et al.*, 2021).

Na atualidade, os produtos naturais são utilizados principalmente em sociedades não industrializadas e países em desenvolvimento da África, Ásia e América Latina, principalmente porque são considerados eficazes, de fácil acesso e de baixo custo quando comparados a medicamentos alopáticos (AWUCHI, 2019).

Um dos produtos naturais que vem ganhando destaque nas últimas décadas devido ao seu potencial bioativo é a própolis das abelhas. A própolis é um produto resinoso produzido por espécies de abelhas eussociais a partir de substâncias coletadas de brotos, casca, botões florais e exsudatos resinosos de plantas. As abelhas coletam essas substâncias e as modificam na colmeia através da adição de cera, pólen, e produtos do seu metabolismo, como as enzimas salivares (BRASIL, 2001).

No Brasil, um tipo especial de própolis produzido pelas abelhas nativas é conhecido e amplamente utilizado pelas populações tradicionais. A geoprópolis é um tipo diferenciado de própolis, preparada pelas abelhas sem ferrão e consiste numa mistura de resinas vegetais, cera, grãos de pólen e argila (NOGUEIRA-NETO, 1997; VILLAS-BOAS, 2018).

A composição química da geoprópolis depende da especificidade da flora no local de coleta. Muitos constituintes foram identificados a partir da geoprópolis de meliponíneos. Compostos fenólicos, como flavonóides, ácidos fenólicos e ésteres de ácido fenólico, foram relatados como principais constituintes da própolis a partir de zonas tropicais (BANKOVA, 2009; SANTOS *et al.*, 2017; LAVINAS *et al.*, 2019).

A atividade biológica da geoprópolis normalmente depende do número de compostos fenólicos presentes, estes compostos são indicados como sendo os responsáveis pela grande variedade de propriedades terapêuticas, tais como atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antivirais e antioxidante (SILVA *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2017).

Devido à alta concentração de compostos fenólicos e outros compostos antioxidantes, a geoprópolis pode ser considerada um potencial conservante para aumentar a vida de prateleira de alimentos, principalmente os de origem animal. Nesses produtos a geoprópolis pode atuar no controle da carga microbiana deteriorante e patogênica altamente presente e também como

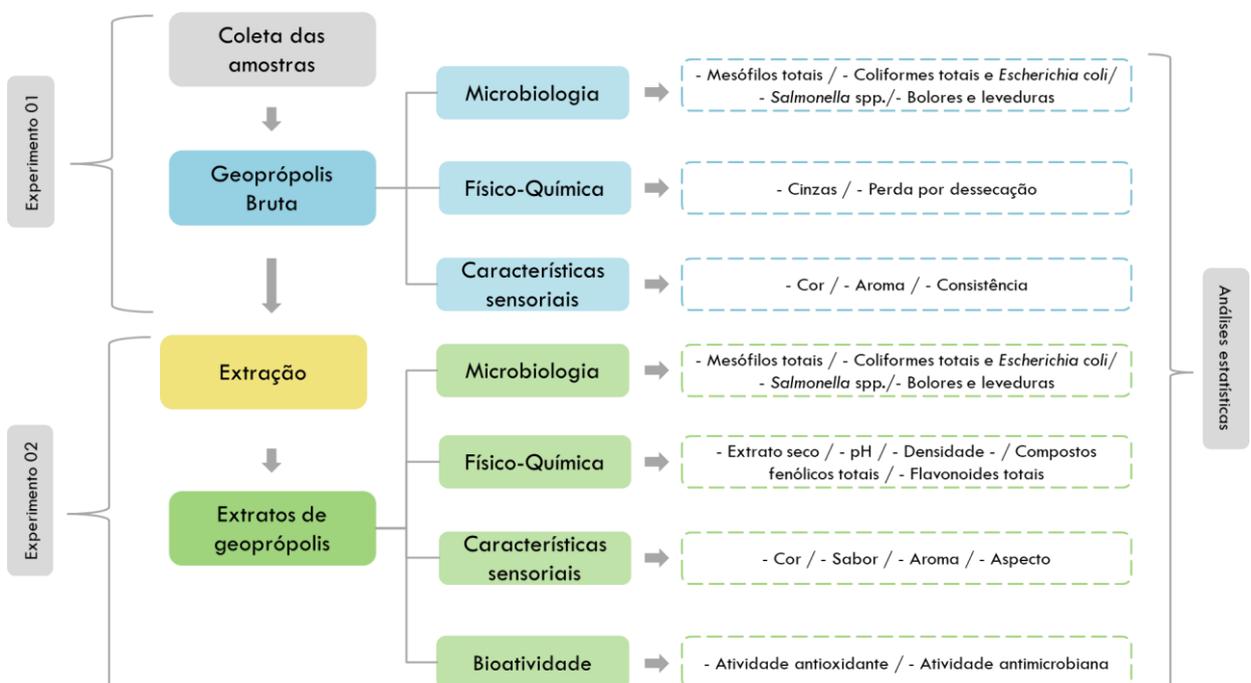
um antioxidante natural (DUMAN; OZPOLAT, 2015; KUNRATH *et al.*, 2017; PAYANDAN *et al.*, 2017; KHODAYARI *et al.*, 2019).

Na região semiárida do Brasil a abelha jandaíra (*Melipona subnitida*), espécie nativa da região semiárida do nordeste brasileiro vem ganhando destaque devido ao potencial bioativo da sua geoprópolis (SOUSA *et al.*, 2018). Porém, ainda são escassos os estudos que buscaram elucidar as propriedades fitoquímicas da geoprópolis da abelha jandaíra e seu potencial uso como fármaco e/ou conservante alimentar. Desta forma, o presente estudo objetivou caracterizar a geoprópolis bruta e os extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas etapas e foi desenvolvido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). A primeira etapa do estudo consistiu em coletar e caracterizar a geoprópolis bruta de abelha jandaíra da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte. A segunda etapa do estudo consistiu em desenvolver e caracterizar um processo de extração de componentes bioativos da geoprópolis identificando as propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais dos extratos produzidos além de seu potencial bioativo como conservante natural de alimentos (Figura 1).

Figura 7. Fluxograma experimental simplificado.

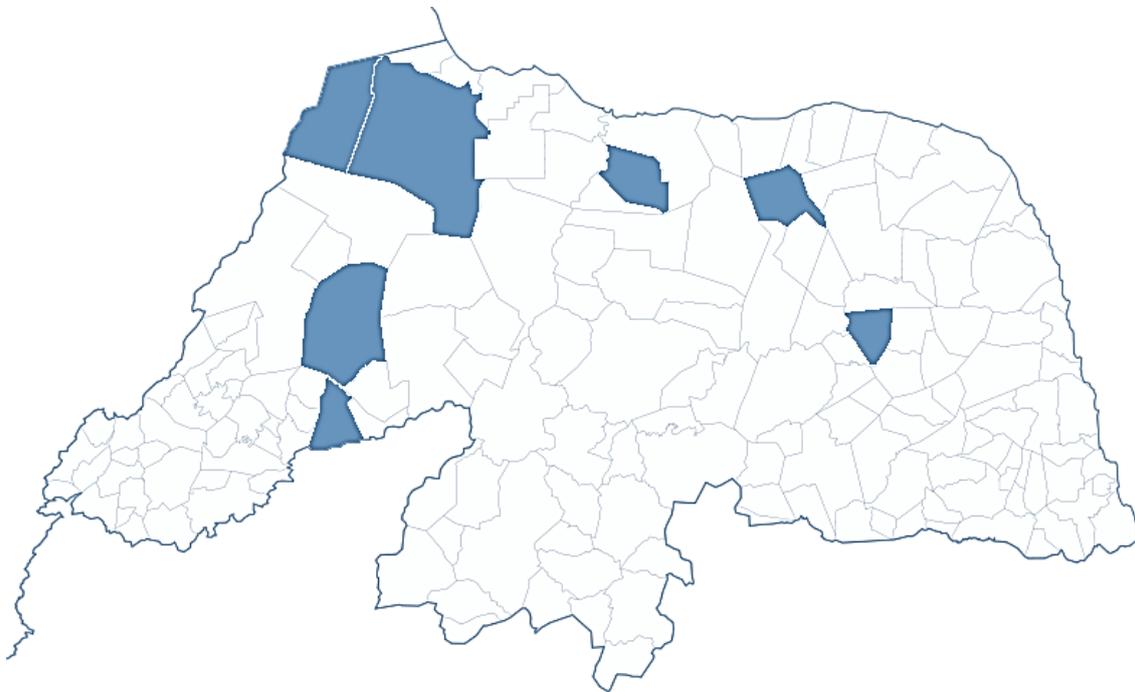


Fonte: Kewen Santiago

2.1 EXPERIMENTO 1 - Caracterização da geoprópolis bruta de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.

Foram coletadas 10 amostras de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) entre os meses de agosto a novembro de 2019 oriundas de municípios pertencentes à região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Coletaram-se amostras de zona rural e urbana dos municípios: Baraúna, Caraúbas, Jandaíra, Mossoró, Patu, Pendências e Riachuelo (Figura 2).

Figura 8. Municípios do estado do Rio Grande do Norte onde foram coletadas amostras de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).



Fonte: Kewen Santiago.

Foram coletados aproximadamente 100 g de geoprópolis por colmeia de acordo com as boas práticas de coleta e higiene. Em seguida as amostras foram acondicionadas em recipientes estéreis e armazenadas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz até serem analisadas. Foram avaliadas as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais das amostras *in natura*.

2.1.1 Análise microbiológica da geoprópolis bruta

Foram realizadas as seguintes análises nas amostras de geoprópolis bruta: Contagem de bactérias mesófilas totais, coliformes totais e *Escherichia coli*, Detecção de *Salmonella* spp. e bolores e leveduras no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN.

Inicialmente foram diluídas 25 gramas de geoprópolis em 225 mL de água peptonada estéril (diluição 10^{-1}). Em seguida foram realizadas diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo água peptonada estéril até alcançar a diluição 10^{-8} . As diluições produzidas foram utilizadas para todas as análises microbiológicas avaliadas. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.1.1.1 Contagem de bactérias mesófilas totais

Para contagem de bactérias mesófilas totais foi seguido o protocolo estabelecido por Maturin e Peeler (1998) com adaptações. Em placas de petri estéreis foi inoculado 1 ml das diluições previamente obtidas. Em seguida pela técnica de *pour plate* as placas foram preenchidas com ágar padrão para contagem (PCA) a 45 °C. Após o enrijecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.1.1.2 Detecção e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para detecção e contagem de coliformes totais e *E. coli* em amostras de geoprópolis, foi utilizada metodologia estabelecida por Manafi e Kneifel (1989) com modificações. As diluições 10^{-1} a 10^{-8} obtidas foram semeadas pela técnica *spread plate* em placas de ágar cromogênico *Hicoliform* para detecção rápida de coliformes e *E. coli*. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 ° C. Após o período de incubação foram contadas as unidades formadoras de colônia características de coliformes totais (colônias azul-esverdeadas). Para detecção de *E. coli*, adicionou-se 100 µl de reagente de Kovacs nas colônias consideradas suspeitas. Foram consideradas positivas para *E. coli* as colônias que apresentaram fenótipo avermelhado após 2 minutos do uso do reagente de Kovacs. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

2.1.1.3 Detecção de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp. Nas amostras de geoprópolis seguiu-se o protocolo ISO 6579:2007 com adaptações. As diluições 10^{-1} de cada amostra de geoprópolis foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica durante um período de 20 horas. Em seguida alíquotas dessa diluição foram transferidas para os caldos Rappaport-Vassiliadis, Tetratonato e Selenito-Cistina e incubadas por 24 horas a 41 °C em banho-maria. Após a incubação, com o auxílio de alças de transferência descartáveis, os caldos foram repicados para placas de Petri preparadas previamente com ágar manitol lisina violeta cristal verde brilhante (MLCB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). O material foi incubado a 37 °C por 24 horas. As colônias características foram repicadas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) e incubadas por 24 horas a 37 °C. As amostras consideradas positivas (LIA de coloração inalterada e TSI com coloração rosa no ápice, amarela no meio e preta no fundo) foram repicadas para tubos com ágar uréia e incubadas a 37 °C por 24 horas. As amostras que não apresentaram reação de clivagem da ureia (substrato rosado) foram consideradas com presença de *Salmonella* sp. em 25 g de geoprópolis.

2.1.1.4 Contagem de Bolores e Leveduras

Para contagem de bolores e leveduras seguiu-se a metodologia proposta por Tournas *et al.* (1998). Foram preparadas placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico. As placas foram inoculadas através da técnica de *spread plate* com 100 µl das diluições obtidas (10^{-1} a 10^{-8}) e foram incubadas a 25 °C durante cinco dias. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.1.2 Análises físico-químicas e sensoriais da geoprópolis *in natura*

2.1.2.1 Cinzas

Para determinação das cinzas foi seguido o protocolo estabelecido pelo IAL (2008) com modificações. Inicialmente os cadinhos foram mantidos em mufla a 600 °C por uma hora e em seguida colocados em dessecador por 30 minutos. Foi aferida a massa em gramas dos cadinhos e neles pesou-se 5 gramas de amostra de geoprópolis em seguida foram destinados à mufla a 600 °C por quatro horas. Após o período de incineração, os cadinhos foram colocados em dessecador, e após resfriados aferiu-se a massa novamente. A porcentagem de cinzas foi determinada pela seguinte equação. Os resultados foram expressos em g/100 g.

Cinzas = (Massa do cadinho com cinzas - Massa do cadinho vazio / Massa da amostra) x 100

2.1.2.2 Perda por dessecação

Para determinação da perda por dessecação na geoprópolis bruta seguiu-se a metodologia estabelecida pelo IAL (2008) com modificações. Primeiramente cadinhos foram levados à estufa de secagem a 105 °C por uma hora.

Após resfriados, foram pesadas 5 gramas de amostra de geoprópolis e acondicionadas dentro dos cadinhos, a massa do conjunto foi aferida (massa inicial). Em seguida os cadinhos foram colocados em estufa de secagem a 105 °C por quatro horas. Após o período de secagem, os cadinhos foram colocados em dessecador para e em sequência aferiu-se a massa novamente (massa final). A porcentagem de cinzas foi determinada pela seguinte equação. Os resultados foram expressos em g/100 g.

$$\text{Perda por dessecação} = [(\text{Massa inicial} - \text{Massa final}) / \text{Massa da amostra}] \times 100$$

2.1.2.3 Características sensoriais da geoprópolis bruta

As análises das características sensoriais das amostras de geoprópolis (cor, aroma e consistência) foram realizadas de acordo com o regulamento técnico para fixação de qualidade de própolis. Os resultados foram obtidos com base nos padrões classificatórios estabelecidos pelo regulamento (BRASIL, 2001).

2.2 EXPERIMENTO 2 – Produção e caracterização de extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte

2.2.1 Produção de extratos de geoprópolis

Para a produção dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis foi seguido o protocolo sugerido por Silva (2013) com modificações. De início as amostras de geoprópolis foram submetidas a uma limpeza manual com o objetivo de remover eventuais impurezas. Em seguida as amostras foram pulverizadas com auxílio de almofariz e pistilo.

A partir do pó obtido foram pesadas 30 gramas de cada amostra e acondicionadas em frascos âmbar estéreis com capacidade de 120 mL, em sequência adicionou-se 70 mL de álcool

etílico de arroz 70 °GL dentro de cada frasco. A mistura foi agitada manualmente, por um minuto, a cada 12 horas, durante 45 dias, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Após o período de extração, a solução obtida foi filtrada em filtro de papel 100% celulose gramatura 54G/M2. O filtrado obtido foi acondicionado em frascos âmbar estéreis de 100 mL e armazenados em geladeira a 6 ± 2 °C até o momento das análises.

Este protocolo foi escolhido por ser uma metodologia eficiente, de fácil acesso, baixo custo e frequentemente empregada por meliponicultores para produção e uso/comercialização de extratos de geoprópolis.

2.2.2 Análises da segurança microbiológica dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis

Para verificar a segurança microbiológica dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis foram realizadas as seguintes análises microbiológicas: Contagem de bactérias mesófilas totais, coliformes totais e *Escherichia coli*, detecção de *Salmonella* spp. e bolores e leveduras. Foram utilizadas as metodologias dispostas no item 2.1.1.

2.2.3 Análises das características físico-químicas dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis

2.2.3.1 Determinação de resíduo seco (extrato seco) em amostras de geoprópolis

A determinação do resíduo seco foi realizada seguindo a metodologia sugerida pela Instituto Adolfo Lutz (2008) com modificações. Cadinhos foram etiquetados, colocados em estufa a 105 °C por uma hora. Após resfriados, a massa dos cadinhos foi aferida (massa inicial). Em seguida, alíquotas de 2 ml dos extratos foram dispostas em cada cadinhos.

Logo após, os cadinhos foram aquecidos em estufa de secagem a 105 °C até total evaporação do solvente presente. Após secagem, os cadinhos foram resfriados em dessecador por duas horas. Depois de resfriados, a massa dos cadinhos foi novamente aferida (massa final). A porcentagem de resíduo seco (extrato seco) foi determinada pela seguinte equação. Os resultados foram expressos em g/100 ml.

$$\text{Resíduo seco} = [(\text{Massa final} - \text{Massa inicial}) / \text{Volume da amostra}] \times 100$$

2.2.3.2 Determinação do pH

Para aferição do pH foi seguido o protocolo sugerido pelo IAL (2008). Os extratos foram dispostos em béqueres de 50 mL e o pH foi aferido diretamente na amostra através de um pHmetro de bancada, previamente calibrado.

2.2.3.3 Determinação da densidade relativa

Para calcular a densidade dos extratos hidroetanólico de geoprópolis foi seguido o método do picnômetro sugerido pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). De início aferiu-se, em balança analítica de precisão, a massa do picnômetro vazio; em seguida colocou-se água destilada no picnômetro até marcação indicada e anotou-se a massa do picnômetro mais a água. Logo após, foi colocada a amostra de mel no picnômetro previamente seco e limpo e sua massa foi aferida. O valor da densidade do mel (D_{mel}) foi calculado através da fórmula a seguir. Os resultados foram expressos em g/ml.

$$\text{Densidade} = \frac{\text{Massa do picnômetro com extrato} - \text{massa do picnômetro vazio}}{\text{Massa do picnômetro com água} - \text{massa do picnômetro vazio}}$$

2.2.3.4 Compostos Fenólicos Totais (CFT)

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi realizada conforme descrito por Meda *et al.* (2005) com adaptações. Foram pipetados 1 mL de extrato em seguida o conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 50 ml e completou-se o volume do balão com metanol. Da solução produzida foram colocadas alíquotas de 500 μ l em tubos de ensaio e cada alíquota foi adicionada de 2,5 ml de solução de reagente Folin-Ciocalteau (0,2 N) e agitou-se os tubos vigorosamente por 30 segundos. Após 5 minutos de descanso, foram adicionados em cada tubo 2 ml de solução de carbonato de sódio (75 g/L), em seguida os tubos foram novamente agitados 30 segundos e em sequência deixados em repouso, ao abrigo da luz por duas horas. Em seguida mediu-se com o auxílio de um espectrofotômetro a absorbância a 760 nm de cada tubo, metanol foi utilizado como branco. Para os cálculos do teor de compostos fenólicos totais, foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico (20 a 200 mg/L). Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (mg EAG)/100 mL de extrato.

2.2.3.5 Flavonoides Totais (FLT)

O teor de flavonoides totais nas amostras foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Meda *et al.* (2005) com modificações. Foram pipetadas e dispostas em tubos de ensaio alíquotas de 2 ml da solução dos extratos previamente preparados no item 2.2.2.4. Em seguida em cada tubo foi adicionado 2 ml de solução de cloreto de alumínio a 2%, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos. Após 10 minutos de descanso, a absorbância foi mensurada a 415 nm utilizando como branco metanol. Para determinar o teor de flavonoides totais na amostra, uma curva de quercetina (5 a 50 mg/L) foi utilizada como padrão. O teor de flavonoides foi expresso em mg de quercetina (mg EQ) / 100 ml de extrato.

2.2.4 Características sensoriais dos extratos de geoprópolis

As análises das características sensoriais das amostras de geoprópolis (cor, sabor, aroma e consistência) foram realizadas de acordo com o regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis. Os resultados foram obtidos com base nos padrões classificatórios estabelecidos pelo regulamento (BRASIL, 2001).

2.2.5 Potencial bioativo dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis da abelha jandaíra

A redução da vida útil de produtos alimentícios, principalmente os de origem animal, provém da deterioração ocasionada por microrganismos contaminantes e dos processos de oxidação química ou enzimática que ocorrem naturalmente (DAMODARAN; PARKIN, FENNEMA, 2010; ODEYEMI *et al.*, 2020).

Portanto, para avaliar o potencial uso dos extratos de geoprópolis como possível conservante natural para alimentos foram realizados testes de atividade antioxidante e de sensibilidade bacteriana a antimicrobianos.

2.2.5.1 Atividade antioxidante (AA)

A análise da capacidade antioxidante dos extratos de geoprópolis foi avaliada de acordo com o método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) por substâncias antioxidantes derivadas de produtos apícolas (MEDA *et al.*, 2005).

Este método baseia-se no princípio de que radical DPPH, ao aceitar um átomo de hidrogênio da molécula eliminadora, isto é, antioxidante, resultando na redução do ponto DPPH para DPPH₂, a coloração naturalmente púrpura do DPPH muda para amarelo de acordo com sua mudança para DPPH₂. A mudança de cor é monitorada por espectrofotometria e utilizada para a determinação de parâmetros de propriedades antioxidantes (MISHRA *et al.*, 2012).

De início foram preparadas soluções com base no extrato bruto nas concentrações 100, 80, 60, 40 e 20 mg/ml. Em seguida, Alíquotas de 1 ml de cada diluição preparada foi adicionada a tubos de ensaio contendo 2,5 ml de solução metanólica de DPPH. Os tubos foram agitados delicadamente e deixados para descansar por 15 minutos ao abrigo da luz.

Em seguida foi mensurada absorvância das amostras a 517 nm utilizando como branco metanol. Foi medido também a absorvância da solução metanólica de DPPH utilizada para servir como controle. A atividade antioxidante dos extratos foi obtida considerando o percentual de inibição do radical DPPH, calculado conforme fórmula a seguir.

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100$$

Para calcular a CE₅₀ dos extratos foram formuladas curvas de porcentagem de inibição de DPPH x concentração de extrato bruto. A regressão linear do CE₅₀ foi calculada de acordo com a curva elaborada. Os resultados de CE₅₀ foram expressos em µg/mL.

2.2.5.2 Atividade antimicrobiana

Para verificar a atividade antimicrobiana dos extratos utilizou-se a metodologia de disco-difusão em ágar estabelecida por Bauer *et al.* (1966) com modificações.

2.2.5.2.1 Cepas bacterianas utilizadas

As cepas utilizadas foram provenientes de coleções padronizadas pela *American Type Cell Culture* (ATCC) e isoladas de alimentos de origem animal artesanais da região semiárida do Rio Grande do Norte (Tabela 01).

As cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) foram adquiridas comercialmente. Dez cepas de *S. aureus* foram isoladas de alimentos de origem animal artesanais fabricados em municípios da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte. Para identificação molecular e confirmação das cepas de *S. aureus*, as amostras foram submetidas à extração de DNA, PCR

para amplificação do gene *nuc* e eletroforese em gel para confirmação molecular através da leitura das bandas características (SASAKI *et al.*, 2010).

Tabela 1. Cepas bacterianas utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de abelha jandaíra.

Cepas Bacterianas	Padrão/Origem
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Staphylococcus aureus</i> 01	Carne de sol
<i>Staphylococcus aureus</i> 02	Carne de sol
<i>Staphylococcus aureus</i> 03	Queijo tipo coalho
<i>Staphylococcus aureus</i> 04	Carne de sol
<i>Staphylococcus aureus</i> 05	Carne de Carneiro
<i>Staphylococcus aureus</i> 06	Linguiça de Carneiro
<i>Staphylococcus aureus</i> 07	Linguiça de carne de sol e Queijo
<i>Staphylococcus aureus</i> 08	Queijo tipo coalho
<i>Staphylococcus aureus</i> 09	Queijo tipo coalho
<i>Staphylococcus aureus</i> 10	Queijo tipo coalho

2.2.5.2.2 - Preparação do inóculo

Para preparação do inóculo as cepas selecionadas foram repicadas em tubos contendo caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas. Após o período de incubação, os inóculos obtidos foram diluídos com o objetivo de atingir o padrão na escala 0,5 de McFarland de suspensão bacteriana com aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Utilizou-se a leitura de densidade óptica a 600 nm (OD_{600}) obtida por espectrofotometria para ajustar a turbidez das suspensões bacterianas.

2.2.5.2.3 - Teste de difusão em discos

Placas de petri com diâmetro de 150 mm previamente preparadas com ágar Mueller-Hinton foram semeadas com os inóculos padronizados das cepas bacterianas selecionadas.

Cada um dos dez extratos hidroetanólicos de geoprópolis foram submetidos ao método de diluição seriada, em tubos de ensaio estéreis, com álcool etílico de arroz (70 °GL). Foram utilizadas as seguintes proporções de extrato para seu diluente: 100/0, 75/25, 50/50, 25/75, 12,5/87.5 e 6,25/93,75.

Nas placas semeadas foram adicionados, em duplicata, discos de papel filtro embebidos nas diluições dos extratos. Como controle negativo foram utilizados discos embebidos em álcool etílico de arroz (70 °GL). Como controle positivo utilizaram-se discos padronizados para antibiograma de Cefalexina 30 µg para bactérias gram-positivas (*S. aureus*) e Ampicilina 10 µg para bactérias gram-negativas (*E. coli* e *S. typhimurium*). As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, com auxílio de um paquímetro foram medidos os diâmetros dos halos e os resultados foram expressos em milímetros de inibição. A leitura dos resultados e interpretação de sensibilidade aos antimicrobianos seguiu os parâmetros estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2020).

Os resultados da susceptibilidade aos extratos hidroetanólicos de geoprópolis foram expressos em termos de tamanho de diâmetro do halo de inibição do crescimento microbiano, padronizado e considerado na maior concentração utilizada como: menor que 9 mm não ativo (NA); 9-14 mm, atividade parcial (P); maior que 14 a 17 mm, ativo (A) e maior que 17 mm, muito ativo (MA) (AYRES *et al.*, 2008).

2.3 Análises estatísticas

Os resultados referentes a presença de microrganismos, composição físico-química e atividades antioxidante e antimicrobianas foram expressos em valores de média e desvio padrão e expostos por meio de tabelas.

Os resultados das características sensoriais de geoprópolis bruta e dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis foram expostos de maneira descritiva por meio de tabelas.

Foi realizado regressão linear entre o teor de cinzas na geoprópolis *in natura* e o teor de resíduo seco, compostos fenólicos e flavonoides encontrados no extrato de geoprópolis. Os resultados foram expressos em forma de gráfico.

A influência do teor de cinzas na geoprópolis *in natura* e do extrato seco nos extratos de geoprópolis frente ao teor de fenóis totais, flavonoides e a atividade antioxidante (CE₅₀) foi analisada através de correlação de Spearman. Os resultados foram expressos na forma de tabela.

3 RESULTADOS

3.1 Microbiologia de geoprópolis *in natura* e de extratos hidroetanólicos de *M. subnitida*

Através dos resultados obtidos foi possível constatar que não houve detecção de *Salmonella* sp. e *E. coli* em nenhuma das amostras de geoprópolis bruta e de extratos hidroetanólicos de geoprópolis analisadas.

Em contrapartida, foi observada contaminação microbiológica de bactérias mesófilas, coliformes totais e bolores e leveduras nas amostras de geoprópolis bruta. A contagem de bactérias mesófilas variou de 3,3 a 6,3 log₁₀ UFC/g nas amostras, enquanto a contagem de coliformes totais variou de 1,03 a 2,64 log₁₀ UFC/g. Na análise de bolores e leveduras, valores mais elevados de contagem foram detectados com médias variando de 4,76 a 8,07 log₁₀ UFC/g entre as amostras analisadas (Tabela 2).

Diferentemente da geoprópolis bruta, a carga microbiana dos respectivos extratos foi quase nula e ficou abaixo do limiar de detecção das metodologias utilizadas para contagem de microrganismos (Tabela 2). A carga microbiana reduzida nos extratos quando comparada à matéria prima é um indicativo de que o processo de extração é eficiente na inativação da flora microbiana natural da geoprópolis *in natura*.

Tabela 2. Microrganismos pesquisados na geoprópolis bruta e nos respectivos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

	Geoprópolis <i>in natura</i>			Extratos hidroetanólicos de geoprópolis		
	Bactérias Mesófilas (log ₁₀ UFC/g)	Coliformes totais (log ₁₀ UFC/g)	Bolores e leveduras (log ₁₀ UFC/g)	Bactérias Mesófilas (log ₁₀ UFC/g)	Coliformes totais (log ₁₀ UFC/g)	Bolores e leveduras (log ₁₀ UFC/g)
G1	6,3 ± 0,57	2,64 ± 0,08	5,23 ± 0,05	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G2	4,5 ± 0,57	1,4 ± 0,08	6,09 ± 0,04	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G3	3,3 ± 0,04	1,64 ± 0,05	4,76 ± 0,05	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G4	3,78 ± 0,13	2,25 ± 0,08	5,98 ± 0,06	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G5	5,23 ± 0,08	2,03 ± 0,12	7,85 ± 0,003	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G6	5,04 ± 0,04	1,07 ± 0,09	6,27 ± 0,07	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G7	6,3 ± 0,01	2,32 ± 0,14	8,07 ± 0,001	< 1,48	< 1,3	< 1,18

G8	4,87 ± 0,03	1,46 ± 0,06	7,16 ± 0,07	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G9	5,55 ± 0,04	1,03 ± 0,05	5,92 ± 0,02	< 1,48	< 1,3	< 1,18
G10	5,93 ± 0,02	1,21 ± 0,04	5,62 ± 0,1	< 1,48	< 1,3	< 1,18

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=2).

3.2 Características físico-químicas de geoprópolis *in natura* e de extratos hidroetanólicos de *M. subnitida*

Das amostras de geoprópolis *in natura* avaliadas, o teor de cinzas encontrado variou de 37,5 a 82,0 g/100 g. Apenas 20% das amostras analisadas apresentaram teor de cinzas inferior a 50 g/100 g, ou seja, 80 % das amostras de geoprópolis analisadas apresentaram mais da metade de sua composição baseada em argila e outros compostos minerais coletados pelas abelhas. A perda por dessecação nas amostras de geoprópolis não se mostrou intensa e variou de 1,4 a 4,9 g/100 g (Tabela 3).

Nos extratos de geoprópolis avaliados foi possível observar variações de pH entre 4,15 a 5,9. A densidade variou entre 0,796 a 0,859 g/cm³ nas amostras analisadas. Observou-se no teor de resíduo seco das amostras valores de 1,0 a 17,9 g/100 ml. Apenas 20% das amostras testadas apresentaram mais de 10 g/100 ml de compostos extraídos em sua composição. O valor de compostos fenólicos totais variou de 3,2 a 41,7 mg EAQ/g e o de flavonoides variou de 1,2 a 49,0 mg EQ/g (Tabela 3).

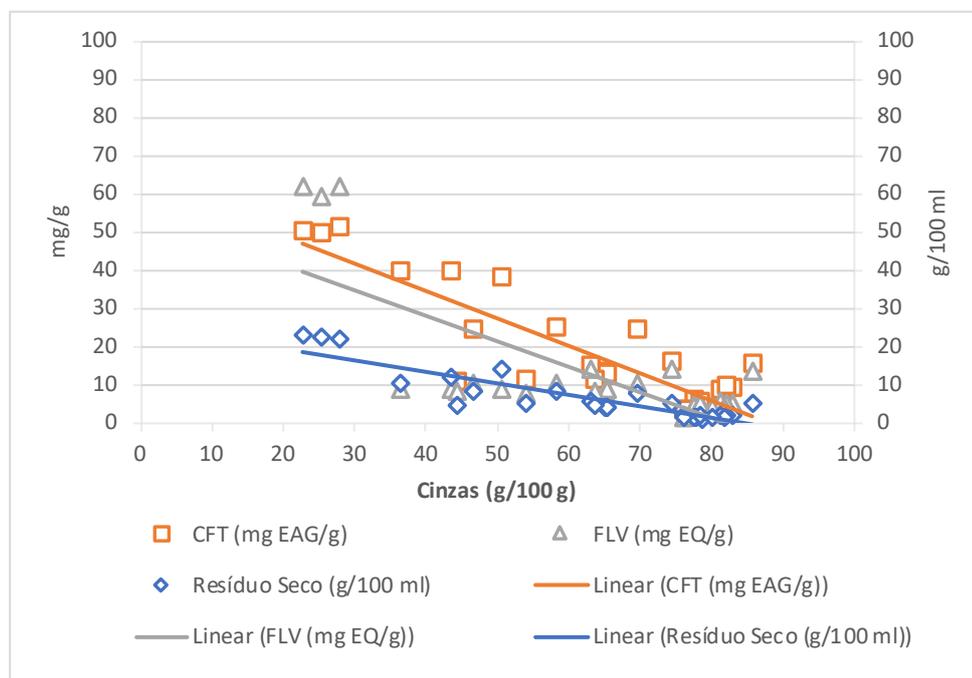
Tabela 3. Características físico-químicas da geoprópolis bruta e dos extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

	Geoprópolis <i>in natura</i>			Extratos hidroetanólicos de geoprópolis			
	Cinzas (g / 100 g)	PD (g / 100g)	pH	Resíduo Seco (g/100 ml)	Densidade (g/cm3)	CFT (mg EAQ/g)	FLV (mg EQ/g)
G1	58,1 ± 11,4	4,9 ± 0,5	4,80	7,8 ± 0,09	0,836 ± 0,004	24,4 ± 0,26	10,1 ± 0,011
G2	65,2 ± 0,1	4,7 ± 0,3	4,73	3,7 ± 0,11	0,814 ± 0,002	12,8 ± 0,54	8,3 ± 0,155
G3	43,3 ± 7,0	4,1 ± 0,4	4,86	11,9 ± 1,64	0,859 ± 0,002	39,0 ± 0,95	8,4 ± 0,015
G4	82,0 ± 0,8	1,4 ± 0,3	4,15	1,8 ± 0,08	0,807 ± 0,009	9,0 ± 0,53	5,1 ± 0,046
G5	37,5 ± 2,6	3,7 ± 0,0	5,27	17,9 ± 0,68	0,853 ± 0,008	41,7 ± 0,80	49,0 ± 1,345
G6	75,8 ± 11,3	4,0 ± 0,5	5,82	3,7 ± 0,08	0,807 ± 0,003	11,4 ± 0,36	10,4 ± 0,140
G7	80,1 ± 1,5	4,9 ± 0,5	5,82	1,0 ± 0,15	0,796 ± 0,010	3,8 ± 0,12	3,9 ± 0,082
G8	53,8 ± 9,6	4,2 ± 0,2	5,06	4,6 ± 0,06	0,816 ± 0,004	11,1 ± 0,30	7,8 ± 0,055
G9	77,8 ± 0,4	2,1 ± 0,1	5,90	1,4 ± 0,07	0,801 ± 0,005	5,5 ± 0,38	4,6 ± 0,086
G10	76,1 ± 0,0	3,8 ± 0,1	5,57	1,5 ± 0,03	0,815 ± 0,017	3,2 ± 0,14	1,2 ± 0,003

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=3). PD: Perda por dessecação; CFT: Compostos fenólicos totais; FLV: Flavonoides; EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina.

O teor de matéria mineral presente nas amostras de geoprópolis *in natura* se mostraram como uma característica de forte influência nas propriedades físico-químicas de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. subnitida* (Figura 3). Através de regressão linear foi possível identificar que quanto maior o teor cinzas presente nas amostras de geoprópolis bruta menor será o teor de resíduo seco ($R^2 = 0,890$; $P < 0,001$), de compostos fenólicos totais ($R^2 = 0,880$; $P < 0,001$) e de flavonoides ($R^2 = 0,740$; $P < 0,001$) nos extratos.

Figura 3. Regressão linear entre o teor de cinzas na geoprópolis bruta e os teores de resíduo seco, compostos fenólicos totais e flavonoides nos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*).



CFT: Compostos fenólicos totais; FLV: Flavonoides; EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina. Linhas retas no gráfico indicam regressão linear ($P < 0,001$). Fonte: Kewen Santiago.

3.3 Características sensoriais de geoprópolis *in natura* e de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. subnitida*

Os resultados obtidos através da análise das características sensoriais da geoprópolis bruta apresentaram em temperatura ambiente, consistências que variaram entre maleável resinosa a rígido argiloso. Das amostras analisadas, 30 % apresentaram consistência maleável composta predominantemente por resinas e 70% apresentaram consistência rígida predominantemente composta por argila. A coloração marrom foi predominante nas amostras de geoprópolis bruta, mas tonalidades avermelhadas, esverdeadas e amareladas também foram

identificadas. Em relação ao aroma, o cheiro balsâmico pôde ser sentido em 70% das amostras analisadas enquanto o aroma resinoso foi notado em 30% das amostras (Tabela 4).

Em relação aos extratos hidroetanólicos de geoprópolis, a maioria das amostras apresentaram coloração em tons âmbar (70%). No entanto, três amostras apresentaram-se de coloração amarelada. Os sabores observados nas amostras variaram do amargo ao picante forte e balsâmico. Foi possível identificar diferentes notas de aromas nos extratos de geoprópolis, dentre elas o aroma balsâmico destacou-se como o mais encontrado (70%). O aroma resinoso foi identificado em 30% das amostras analisadas. Em todas as amostras de extratos verificou-se o aspecto líquido, límpido e homogêneo (Tabela 4).

Tabela 4. Características sensoriais da geoprópolis bruta e dos respectivos extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

	Geoprópolis <i>in natura</i>			Extratos hidroetanólicos de geoprópolis			
	Cor	Aroma	Consistência	Cor	Sabor	Aroma	Aspecto
G1	Marrom	Resinoso	Rígido (argiloso)	Âmbar claro	Amargo	Resinoso suave	Líquido, límpido e homogêneo
G2	Marrom escuro	Balsâmico	Rígido (argiloso)	Âmbar	Balsâmico	Balsâmico	Líquido, límpido e homogêneo
G3	Marrom escuro	Balsâmico	Maleável (resinoso)	Âmbar escuro	Suave balsâmico	Balsâmico suave	Líquido, límpido e homogêneo
G4	Marrom claro	Resinoso	Rígido (argiloso)	Âmbar escuro	Picante suave	Resinoso	Líquido, límpido e homogêneo
G5	Marrom esverdeada	Balsâmico	Maleável (resinoso)	Âmbar escuro	Picante forte	Balsâmico	Líquido, límpido e homogêneo
G6	Marrom avermelhada	Balsâmico	Rígido (argiloso)	Amarelo	Balsâmico	Balsâmico	Líquido, límpido e homogêneo
G7	Marrom	Balsâmico	Rígido (argiloso)	Amarelo claro	Suave balsâmico	Balsâmico suave	Líquido, límpido e homogêneo
G8	Marrom escuro	Balsâmico	Maleável (resinoso)	Âmbar	Picante forte	Balsâmico	Líquido, límpido e homogêneo
G9	Amarelada	Resinoso	Rígido (argiloso)	Amarelo claro	Amargo suave	Resinoso	Líquido, límpido e homogêneo
G10	Marrom escuro	Balsâmico	Rígido (argiloso)	Âmbar claro	Picante suave	Balsâmico	Líquido, límpido e homogêneo

3.4 Potencial bioativo de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. subnitida*

3.4.1 Potencial antioxidante dos extratos hidroetanólicos de *M. subnitida*

A partir dos dados obtidos foi possível observar atividade antioxidante considerável em todos os extratos hidroetanólicos de geoprópolis analisados (Tabela 5). O percentual de inibição do radical DPPH nas amostras analisadas variou entre 41,73 a 95,74%. Dentre essas amostras, mais de um terço conseguiu sequestrar mais de 80 % dos radicais de DPPH.

A concentração efetiva (CE_{50}) determina a concentração necessária dos extratos de geoprópolis para reduzir em 50% a concentração inicial do DPPH. Quanto maior a atividade de sequestro do radical livre DPPH, menor é a dosagem necessária de extrato para inibir 50 % do DPPH (CE_{50}). Os valores de CE_{50} variaram entre 0,16 a 4,16 $\mu\text{g/ml}$ com destaque para as amostras G1 e G5 que apresentaram CE_{50} de 0,24 e 0,16 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5. Potencial antioxidante de extratos de geoprópolis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

	Atividade Antioxidante	
	% de inibição	CE_{50} $\mu\text{g/mL}$
G1	95,43 \pm 0,17	0,24 \pm 0,018
G2	81,85 \pm 3,14	0,66 \pm 0,010
G3	95,74 \pm 0,26	0,43 \pm 0,023
G4	76,11 \pm 4,28	0,85 \pm 0,103
G5	91,30 \pm 2,36	0,16 \pm 0,002
G6	89,75 \pm 0,35	0,47 \pm 0,027
G7	41,73 \pm 1,92	4,16 \pm 0,413
G8	76,11 \pm 4,98	0,79 \pm 0,070
G9	52,72 \pm 1,22	1,79 \pm 0,130
G10	51,67 \pm 1,48	1,85 \pm 0,144

CE_{50} : concentração efetiva. Resultados apresentados em média \pm desvio padrão (n=3).

Através de correlação de Spearman foi possível constatar forte influência de fatores como teor de cinzas na geoprópolis bruta, resíduo seco, compostos fenólicos e flavonoides na CE_{50} dos extratos (Tabela 6).

Observou-se que houve correlação forte e positiva entre o teor de cinzas das amostras de geoprópolis bruta e a CE_{50} ($r_s = 0,728$; $p < 0,000001$). A partir deste dado é possível concluir que quanto maior o teor de solo e de matéria mineral coletado pelas abelhas, maior será a dose necessária de extrato para obter-se uma atividade antioxidante formidável.

Foi constatado correlação forte e negativa entre a CE_{50} e as variáveis resíduo seco ($r_s = -0,955$; $p < 0,000001$) compostos fenólicos totais ($r_s = -0,960$; $p < 0,000001$) e flavonoides totais ($r_s = 0,925$; $p < 0,000001$). A partir destes dados conclui-se que quanto maior for a concentração de compostos extraídos, menor será a necessidade de amostra para se obter atividade antioxidante considerável.

Tabela 6. Correlação de Spearman (rs) entre o teor de cinzas presente na geoprópolis bruta e o resíduo seco, o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante dos extratos de geoprópolis.

	Cinzas	Resíduo seco	CFT	FLV
Resíduo Seco	-0,788			
CFT	-0,728	0,950		
FLV	-0,616	0,886	0,927	
AA _{CE50}	0,728	-0,955	-0,960	-0,925

Correlações fracas (>0,3); Correlações moderadas (>0,5); Correlações fortes (>0,7). Valores em negrito indicam correlação significativa ($p < 0,000001$). CFT: Compostos fenólicos totais; FLA: Flavonoides; AA: atividade antioxidante (CE₅₀).

3.4.2 Potencial Antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de *M. subnitida*

A atividade inibitória dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis foi avaliada através da medição da formação de halo de inibição (mm). Foi possível constatar maiores valores de inibição frente ao microrganismo gram-positivo (*S. aureus* ATCC 25923) quando comparado às cepas gram-negativas *E. coli* ATCC 25922 e *S. typhimurium* ATCC 14028 (Tabela 7).

Tabela 7. Classificação do potencial antimicrobiano de extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* frente a cepas padrões de microrganismos.

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	
	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação
G1	14,0	P	8,00	NA	9,25	P
G2	10,5	P	10,50	P	10,6	P
G3	15,0	A	5,90	NA	9,4	P
G4	13,5	P	13,50	P	9	P
G5	15,5	A	9,00	P	9,25	P
G6	18,0	MA	12,50	P	7,5	NA
G7	19,0	MA	12,50	P	11,5	P
G8	21,5	MA	11,50	P	7,5	NA
G9	16,0	A	9,85	P	9,6	P

G10	14,0	P	12,50	P	5	NA
CFE_{30µg}	22,5	MA	-	-	-	-
AMP_{10µg}	-	-	19,8	MA	23,4	MA

< 9 mm (NA - não ativo); 9-14 mm (PA - parcialmente ativo); > 14 a 17 mm (A - ativo); > 17 mm (MA - muito ativo). CFE: Cefalexina; AMP: Ampicilina.

Todos os extratos testados conseguiram inibir o crescimento da cepa padrão de *S. aureus* com valores de halo que variaram entre 10,5 a 22,5 mm de inibição. Dessas amostras, 40 % se mostraram muito efetivas (> 17 mm), 10 % se mostraram efetivas (14 a 17 mm) e 60 % se mostraram parcialmente ativas (9 a 14 mm). A amostra G8 destacou-se por demonstrar atividade inibitória similar ao controle positivo de Cefalexina, 21,5 e 22,5 respectivamente demonstrando o potencial desse produto quando comparado ao tratamento padrão.

Em relação à cepa padrão de *E. coli*, 80% dos extratos testados apresentaram atividade inibitória parcialmente efetiva com valores que variaram de 9 a 13,5 mm de inibição. 20 % das amostras não apresentaram atividade inibitória frente a *E. coli* com halos que variaram de 5,9 a 8,0 mm de inibição. Resultados semelhantes foram encontrados frente a cepa padrão de *S. typhimurium* com 70 % das amostras apresentando atividade inibitória parcial (9 a 11,5 mm de inibição) e 30 % sem atividade inibitória considerável (5 a 7,5 mm de inibição).

Quando aplicados às cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos de origem animal, os resultados mostraram-se promissores (Tabela 8). As cepas de *S. aureus* 01 e 10 se mostram mais sensíveis aos extratos utilizados, halos com mais de 14 mm de inibição. As cepas de *S. aureus* 02, 04, 05, 06, 07, 08 e 09 mostraram-se parcialmente sensíveis aos extratos de geoprópolis, em sua maioria encontraram-se halos de inibição que variaram de 9 a 14 mm. Destaca-se a cepa *S. aureus* 03 que se mostrou resistente até à cefalexina, porém foi inibida parcialmente por 30 % dos extratos utilizados (9 a 10,5 mm de inibição).

O controle negativo utilizado (álcool de cereais 70 °GL), não propiciou a formação de halos de inibição em nenhuma das amostras testadas, ou seja, não demonstrou atividade inibitória contra os microrganismos testados.

Tabela 8. Classificação do potencial antimicrobiano de extratos de geoprópolis de *Melipona subnitida* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de alimentos de origem animal.

	<i>S. aureus</i> A1		<i>S. aureus</i> A2		<i>S. aureus</i> A3		<i>S. aureus</i> A11		<i>S. aureus</i> A14	
	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação	Inibição (mm)	Classificação
G1	16,5	A	8,5	NA	7,0	NA	13,4	P	18,5	MA
G2	17,0	A	7,0	NA	6,5	NA	12,7	P	10,5	P

G3	17,5	A	11,5	P	8,5	NA	10,9	P	11,5	P
G4	18,5	MA	11,0	P	9,5	P	10,2	P	13,0	P
G5	16,5	A	9,8	P	10,5	P	10,9	P	14,0	P
G6	21,5	MA	13,0	P	7,3	NA	8,9	NA	10,5	P
G7	13,0	P	12,0	P	7,5	NA	7,3	NA	7,0	NA
G8	15,5	A	10,5	P	7,0	NA	10,5	P	11,5	P
G9	16,5	A	14,9	A	9,0	P	10,3	P	10,0	P
G10	12,0	P	6,0	NA	6,5	NA	10,6	P	9,5	P
CFE 30 μ g	32,2	MA	34,5	MA	0	NA	22,0	MA	35,3	MA

	<i>S. aureus</i> A16		<i>S. aureus</i> A18		<i>S. aureus</i> A22		<i>S. aureus</i> A33		<i>S. aureus</i> A45	
	Inibição (mm)	Classificação								
G1	9,5	P	14,0	P	18,2	MA	16,0	A	20,3	MA
G2	9,5	P	9,0	P	10,9	P	10,0	P	15,8	A
G3	9,5	P	12,0	P	17,2	MA	12,7	P	20,8	MA
G4	10,5	P	9,5	P	11,1	P	10,3	P	11,3	P
G5	12,0	P	11,5	P	12,2	P	11,8	P	28,2	MA
G6	12,5	P	16,0	A	11,3	P	10,7	P	14,7	A
G7	10,5	P	10,5	P	8,9	NA	7,4	NA	15,2	A
G8	13,0	P	14,0	P	13,9	P	9,8	P	19,0	MA
G9	8,0	NA	10,0	P	11,3	P	10,0	P	15,3	A
G10	10,5	P	10,0	P	13,8	P	11,0	P	11,4	P
CFE 30 μ g	21,5	MA	27,6	MA	30,5	MA	23,4	MA	28,6	MA

< 9 mm (NA - não ativo); 9-14 mm (PA - parcialmente ativo); > 14 a 17 mm (A - ativo); > 17 mm (MA - muito ativo). CFE: Cefalexina

4 DISCUSSÃO

4.1 A geoprópolis como indicador sanitário do manejo de colmeias de *Melipona subnitida*

A geoprópolis das abelhas sem ferrão é um importante material relacionado ao sucesso da construção do ninho e à saúde da colônia. A geoprópolis é utilizada para fechar frestas na colmeia e impedir a invasão por inimigos naturais além de impedir a troca de calor e umidade com o ambiente externo (NOGUEIRA-NETO, 1997).

As abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) também utilizam a própolis para finalidade semelhante de proteger a colmeia de inimigos indesejados e de evitar trocas de calor com o ambiente externo (LAVINAS *et al.*, 2019; SUREK *et al.*, 2021).

Porém, diferentemente das abelhas africanizadas que coletam em sua maioria apenas resinas de plantas para compor sua própolis, as abelhas sem ferrão, em especial algumas

espécies do gênero *Melipona*, misturam a própolis com argila ou terra. O resultado da mistura é um material misto de resinas e solo menos maleável do que a própolis das abelhas *A. mellifera* (BARTH; LUZ, 2003).

As abelhas sem ferrão também utilizam a coleta de solo como uma estratégia de termorregulação para reduzir a temperatura interna da colmeia. A umidade presente no solo coletado evapora no interior da colmeia e propicia a redução da temperatura interna (JONES; OLDROYD, 2007).

Por ser um material essencial ao funcionamento da colmeia, as abelhas sem ferrão estão sempre coletando resinas e solos argilosos para produzir a geoprópolis. Porém, quando criadas em caixas racionais, expostas a condições não naturais e longe de fontes de solo adequadas, as abelhas sem ferrão buscam estratégias para contornar o problema e muitas vezes, para substituir a falta de argila umedecida no ambiente, coletam fezes de vertebrados para misturar com as resinas coletadas e produzir a geoprópolis (NOGUEIRA-NETO, 1997; BRUENING, 2006).

O uso de fezes de vertebrados é um problema sanitário recorrente na criação de meliponíneos em zona rural e zona urbana. O ato de levar fezes para o interior da colmeia pode acarretar a contaminação da geoprópolis a ser coletado e beneficiado, como também dos outros produtos meliponícolas (mel e pólen) que muitas vezes são consumidos *in natura* (RODRIGUES *et al.*, 2018; PARPINELLI *et al.*, 2021).

Nesse estudo foi encontrado uma alta carga microbiana de bactérias mesófilas, de coliformes totais e de bolores e leveduras nas amostras de geoprópolis analisadas. Indicativo de contaminação ambiental do solo coletado pelas abelhas para produzir a geoprópolis.

Através dos dados obtidos no estudo também foi possível constatar que nenhuma amostra de geoprópolis analisada apresentou contaminação por *Salmonella* sp e *E. coli*. A ausência de contaminação por enterobactérias é um indicativo que nas colmeias analisadas não houve coleta de fezes de vertebrados.

A alta carga microbiana encontrada é um indicativo de que a geoprópolis é uma possível fonte de contaminação para todos os produtos meliponícolas e que poderia ser utilizada como um indicador sanitário para o controle de qualidade e fiscalização dos meliponários.

Em fiscalizações de rotina, amostras de geoprópolis poderiam ser coletadas e analisadas em laboratório para avaliar se a presença de animais de produção, mesmo que respeitando os limites de distância impostos pela legislação, influenciariam negativamente na higiene das colmeias.

O uso da geoprópolis da abelha jandaíra como indicador sanitário não é uma realidade distante e inalcançável para o cenário brasileiro atual. No estado da Bahia, a geoprópolis de

Melipona scutellaris já é utilizada com êxito como indicador de contaminação química de metais pesados em zonas urbanas densamente povoadas (BONSUCCESSO *et al.*, 2018).

Estratégias de manejo devem ser adotadas pelos meliponicultores com o intuito de garantir que o mínimo de contaminação microbiana possível seja levado para o interior da colmeia. Uma das estratégias mais comuns e frequentemente utilizadas é o fornecimento de argila umedecida de boa procedência em alimentadores externos com o intuito de se evitar que as abelhas colem fontes contaminadas de solos ou fezes de vertebrados (COSTA-PEREIRA, 2014).

Outra estratégia possível, porém, menos empregada no manejo de meliponíneos é o uso de técnicas de melhoramento animal. Na meliponicultura o melhoramento genético consiste em obter colmeias com características fenotípicas, genotípicas e comportamentais desejadas através da seleção artificial. Através desta técnica é possível traçar estratégias que garantam a seleção e propagação de colmeias de hábitos higiênicos que não possuam preferência pela coleta de fezes de vertebrados (SILVA *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2015; SILVA; LOPES-NETO; RIBEIRO, 2020).

O uso combinado de estratégias de manejo pode garantir a produção segura de produtos meliponícolas evitando a entrada de patógenos na colmeia por meio de coleta de material contaminado.

4.2 Composição físico-química e compostos bioativos da geoprópolis da abelha jandaíra

4.2.1 Composição físico-química da geoprópolis e de extratos de geoprópolis de abelha jandaíra

Na última década, a geoprópolis das abelhas sem ferrão brasileiras está recebendo cada vez mais atenção devido ao reconhecimento e popularidade das suas propriedades biológicas (MIGUEL; FIGUEIREDO, 2017).

Na região semiárida do nordeste do Brasil, a geoprópolis da abelha jandaíra ganhou visibilidade devido ao diferencial de compostos bioativos presentes em sua composição. A riqueza e diversidade de compostos fenólicos e flavonoides coletados por essa espécie fornece uma atividade biológica singular a essa geoprópolis (SOUZA *et al.*, 2013).

Mais de 51 compostos fenólicos, já foram isolados e identificados da geoprópolis da abelha jandaíra, muitos desses, possuidores de atividade bioativa. Souza e colaboradores (2018) conseguiram detectar 4 tipos de galoil glicosídeos, 1 tipo de ácido elágico, 11 tipos de acil-

hexosídeos, 23 tipos de acil-galoil-hexosídeos e 12 flavonóides na geoprópolis de abelha jandaíra em uma região semiárida do estado da Paraíba, Brasil.

Porém, a composição da geoprópolis da abelha jandaíra pode variar de acordo com o ambiente de distribuição da espécie, a fatores genéticos e às condições ambientais as quais a colmeia for submetida (FERREIRA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020; GABRIEL *et al.*, 2021).

No presente estudo as amostras analisadas foram coletadas na região semiárida do estado do rio grande do norte, região dotada de vegetação biodiversa, rica em plantas endêmicas e habitada por uma população genética diferenciada de *M. subnitida* (FERNANDES; QUEIROZ, 2018; JAFFÉ *et al.*, 2019). Esses fatores associados podem garantir uma composição única de substâncias na geoprópolis da abelha jandaíra dessa região, sendo necessários estudos que busquem indentificar estruturalmente cada composto presente na geoprópolis de jandaíra do semiárido potiguar.

Além dos fatores citados acima, colmeias de jandaíra submetidas a ambientes com maior variação de temperatura, menor isolamento térmico em relação ao ambiente externo, presença de frestas e brechas da colmeia e maior incidência de inimigos naturais poderão estar propícias ao desequilíbrio entre coleta de resinas e de solo para produção da geoprópolis (AIDAR, 2011).

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram que abelhas coletoras de maiores proporções de matéria mineral, coletam menos resinas, e por consequência, apresentam teores reduzidos de substâncias bioativas na composição química da geoprópolis. São necessárias estratégias de manejo que garantam a qualidade físico-química da geoprópolis de *M. subnitida* comercializada na região.

A importância deste estudo está no seu pioneirismo em identificar a relação entre a influência da matéria inorgânica presente na geoprópolis e a quantidade de compostos ativos presentes, bem como as características inerentes da geoprópolis como sua microbiota intrínseca. Segundo Lavinias e colaboradores (2019), não existem estudos que buscaram identificar a influência do conteúdo inorgânico (minerais, solo/partículas de argila) ou mesmo da matéria orgânica associada à geoprópolis das abelhas sem ferrão, como microbiota nativa.

4.2.2 Potencial antioxidante

O potencial antioxidante de uma substância é medido pela capacidade que ela possui em inibir a ação de compostos oxidantes conhecidos e padronizados. Alguns métodos analíticos buscam identificar o potencial que a geoprópolis possui em ser utilizada nas indústrias de

alimentos, cosméticos e na medicina, bem como para certificar a sua qualidade. (SAWAYA *et al.*, 2011; LAVINAS *et al.*, 2019).

O método que identifica a captura dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um método bem difundido e empregado na pesquisa da atividade antioxidante de extratos de geoprópolis de abelhas sem ferrão (LAVINAS *et al.*, 2019).

O ensaio DPPH é rotineiramente praticado para avaliação do potencial de eliminação de radicais livres de uma molécula antioxidante. É considerado um dos métodos colorimétricos padrão de fácil acesso para medir o conteúdo antioxidante de extratos naturais elaborados a partir de diferentes sistemas de solventes, incluindo etanol, acetona, metanol, benzeno (MISHRA *et al.*, 2012).

Através dos dados obtidos foi possível constatar que a técnica empregada se mostrou eficiente em avaliar o potencial antioxidante de extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. subnitida*. Também foi possível identificar que a geoprópolis da abelha jandaíra possui potencial como insumo para utilização na indústria de alimentos na forma de antioxidante natural.

4.2.2.1 Uso de extratos de geoprópolis de *M. subnitida* como antioxidante natural para alimentos

A oxidação dos alimentos é uma reação em cadeia que ocorre na presença de oxigênio e é responsável pela deterioração da qualidade dos produtos alimentícios. É afetada pelos métodos de processamento, embalagem e armazenamento, bem como pelos ingredientes do produto (LABUZA; DUGAN, 1971).

Alimentos ricos em proteínas e lipídeos são mais propícios à oxidação de seus compostos devido a fatores como atividade de água, luminosidade, temperatura, enzimas, espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, íons metálicos, entre outros. Alimentos de origem animal são especialmente sensíveis à oxidação devido à riqueza de lipídeos, proteínas, água e minerais em sua composição nutricional (LUND *et al.*, 2011; HELLWIG, 2019).

A oxidação dos alimentos de origem animal afeta diretamente seu valor como produto comercial, pois características como cor, sabor, odor e qualidade nutricional serão influenciados diretamente pela oxidação de seus compostos. Os problemas tecnológicos mais comuns encontrados em alimentos oxidados consistem no escurecimento enzimático e na rancidez

oxidativa, defeitos que causam alteração nas características organolépticas do produto e repulsa ao consumidor final (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2017).

A adição de conservantes sintéticos atualmente é a ferramenta mais empregada pela indústria para reduzir a oxidação em alimentos perecíveis. Porém, o mercado está cada vez mais exigente quanto ao uso de aditivos sintéticos em alimentos. Por várias razões, o mercado consumidor pode considerar a ingestão de alimentos contendo aditivos artificiais como um risco à saúde (SONG; IM, 2018; GOKOGLU, 2019).

Os aditivos alimentares sintéticos são muitas vezes considerados prejudiciais e até mesmo um risco para a saúde pública. Pesquisas sugerem que os consumidores estão preocupados e gostariam de ser mais bem informados sobre as implicações potenciais para a saúde do uso e consumo de aditivos alimentares sintéticos (BEARTH; COUSIN; SIEGRIST, 2014).

O uso de produtos naturais como antioxidantes de alimentos mostra-se como uma estratégia viável e acessível para substituição dos aditivos sintéticos e já é empregada no cotidiano da indústria (GOKOGLU, 2019).

Os extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *M. subnitida* demonstraram que são ricos em compostos fenólicos e flavonoides, moléculas que possuem alto potencial de redução da oxidação em alimentos. As concentrações de CE₅₀ encontradas na pesquisa são um indicativo de que não são necessárias altas doses dos extratos para que se atinja níveis efetivos de inibição da oxidação. Dessa forma o uso de extratos de geoprópolis como antioxidante natural pode ser viabilizado em escala industrial por não necessitar o emprego de altas concentrações do insumo para fabricação dos alimentos. Dessa forma não são gerados custos extras para a indústria nem poderiam ser ocasionadas alterações organolépticas significativas no produto final.

4.2.3 Potencial Antimicrobiano dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis

O potencial antimicrobiano de uma substância é a capacidade que ela possui em inibir parcialmente ou totalmente o crescimento e multiplicação dos microrganismos. A própolis foi extensivamente estudada por diversos autores e sabe-se que é notável sua capacidade de inibir e/ou controlar o crescimento de uma ampla gama de bactérias, tanto Gram positivas quanto Gram negativas (PETRUZZI *et al.*, 2020).

Seu potencial como controlador do crescimento microbiano trouxe a própolis lugar de destaque em estudos científicos para a elaboração de novos compostos antimicrobianos de ação efetiva (LAVINAS *et al.*, 2019; SUREK *et al.*, 2021).

Neste estudo, dez amostras de extratos de geoprópolis de *M. subnitida* foram testadas com o intuito de avaliar o potencial deste produto oriundo da região semiárida do nordeste brasileiro como potencial fonte de moléculas antimicrobianas. A partir dos dados obtidos na pesquisa foi possível observar um efeito significativo dos extratos de geoprópolis frente as cepas microbianas gram-negativas e gram-positivas, porém algumas cepas microbianas mostraram-se mais sensíveis que outras quando expostas aos extratos. Resultados diferentes também foram encontrados entre os próprios extratos utilizados nos quais alguns extratos apresentaram-se mais efetivos que outros na inibição microbiana.

A riqueza de compostos bioativos presentes na geoprópolis podem justificar o sucesso do uso da substância na inibição do crescimento microbiano. Compostos fenólicos e flavonoides destacam-se como os principais componentes responsáveis pela atividade biológica da geoprópolis (GABRIEL *et al.*, 2021).

A ação antimicrobiana encontrada nos extratos pode estar relacionada ao sinergismo entre compostos fenólicos e outros componentes presentes. Alguns autores sugerem a associação entre as moléculas bioativas promovem danos na membrana citoplasmática das bactérias, causando um aumento da permeabilidade celular, desequilíbrios na concentração de potássio intracelular e por consequência danos nas funções celulares e provável lise celular (EPSTEIN, 2003).

O efeito antimicrobiano dos extratos de geoprópolis pode variar de acordo com a espessura da parede celular dos microrganismos, portanto, entende-se que bactérias gram-positivas estarão mais susceptíveis à ação da própolis já que possuem parede celular mais simples quando comparadas a bactérias gram-negativas (TORRES *et al.*, 2018).

Os dados encontrados nesta pesquisa corroboram com a literatura no qual as cepas microbianas de *S. aureus* se mostraram mais sensíveis a ação dos extratos de geoprópolis quando comparadas com a sensibilidade encontrada nas cepas *E. coli* e *S. typhimurium*. (TORRES *et al.*, 2018; PETRUZZI *et al.*, 2020).

A partir dos resultados obtidos neste estudo é possível inferir que na geoprópolis da abelha jandaíra existem uma diversidade de compostos que podem ser explorados e purificados para uso nas indústrias de alimentos, cosméticos e na medicina como efetivos antimicrobianos.

4.2.3.1 Uso de extratos de geoprópolis de *M. subnitida* como agente antimicrobiano para alimentos

Os microrganismos utilizados para avaliar o potencial antimicrobiano dos extratos de geoprópolis foram escolhidos por serem conhecidos como os principais patógenos microbianos encontrados em alimentos. Problemas graves na saúde de pessoas que consumiram alimentos contaminados com *S. aureus*, *E. coli* e *S. thyphimurium* são notificados mundialmente todos os anos (CDC, 2020).

Em alimentos de origem animal, a contaminação por estes patógenos é ainda mais comum e recorrente já que estas bactérias estão presentes naturalmente na flora microbiana intestinal de diversos animais de produção e do ser humano (JANDA; ABBOTT, 2021).

O uso de antibióticos na produção animal já se consagrou como um problema de higiene induzir a presença cepas resistentes a medicamentos em alimentos de origem animal, o que torna ainda mais grave a presença destes microrganismos já que em alguns casos, os antibióticos podem não ser efetivos no tratamento dos pacientes (LHERMIE; GRÖHN; RABOISSON, 2017; SCHAR *et al.*, 2018).

O extrato de geoprópolis de abelha jandaíra pode ser utilizado em duas vertentes na cadeia produtiva de alimentos de origem animal. Na primeira, os extratos de geoprópolis podem ser utilizados como substitutos aos antibióticos utilizados na produção animal. Por outro lado, os extratos de geoprópolis também podem ser utilizados diretamente como aditivo alimentar natural para inibir a proliferação microbiana nos alimentos de origem animal (SEVEN *et al.*, 2018; YOUNG; LIU, 2021).

As bactérias *E. coli* e *S. thyphimurium* são enterobactérias presentes no trato gastrointestinal de animais de produção e seres humanos. Em processos fabris pode ocorrer a contaminação cruzada entre o conteúdo gastrointestinal desses animais e dos seres humanos com a fabricação do alimento (CARRASCO; MORALES-RUEDA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

Já as bactérias *S. aureus* estão presentes na microbiota da pele e da boca dos seres humanos e de animais de produção, dessa forma podem ser facilmente transmitidas aos alimentos através da manipulação do alimento e por feridas infectadas. Vacas leiteiras também são fonte de contaminação por *S. aureus* através do leite produzido por animais com mastite. *S. aureus* pode ainda colonizar equipamentos de produção ou de confecção de alimentos em zonas mais difíceis de limpar (DITTMANN *et al.*, 2017).

Devido à importância do *S. aureus* como contaminante de alimentos e causador de doenças por ingestão de alimentos contaminados. Este microrganismo foi utilizado neste estudo para avaliar a capacidade que a própolis pode ter em controlar e prevenir possíveis contaminações microbianas em alimentos de origem animal.

Através dos dados obtidos na pesquisa foi possível constatar a eficácia dos extratos hidroetanólicos de *M. subnitida* em controlar o crescimento microbiano de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos. Vale ressaltar que em um dos casos a cepa microbiana se mostrou resistente até mesmo ao antibiótico padrão utilizado, porém extratos de geoprópolis foram eficazes em inibir parcialmente o crescimento microbiano. Resultados semelhantes foram encontrados por Torres e colaboradores (2018) no qual extratos hidroetanólicos de geoprópolis de *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* mostraram-se efetivos contra cepas de *S. aureus* resistentes à metilina.

A inibição microbiana proporcionada pelos extratos é uma evidência do potencial de uso da geoprópolis de *M. subnitida* como conservante alimentar. O sucesso em inibir cepas microbianas de *S. aureus* associado aos resultados obtidos nas análises de compostos fenólicos e flavonoides são um indicativo compostos bioativos podem ser isolados e caracterizados para servirem como alternativas na conservação de alimentos de origem animal.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi demonstrado que a geoprópolis de *Melipona subnitida* é um excelente recurso disponibilizado por essa espécie de abelha e que possui potencial para uso em diversos nichos da produção e beneficiamento dos produtos meliponícolas e de alimentos de origem animal.

A contaminação microbiana encontrada na geoprópolis bruta pode servir como um indicativo das condições sanitárias em que se encontra os meliponários. Por outro lado, o baixo índice de contaminação microbiana encontrado nos extratos de geoprópolis são um indicativo da segurança sanitária da técnica de extração utilizada para a produção e uso dos extratos hidroetanólicos de geoprópolis.

A partir dos dados obtidos também foi possível observar o potencial do uso de extratos de geoprópolis como um conservante natural pela sua capacidade de reduzir a oxidação nos alimentos e por controlar total ou parcialmente o crescimento da flora microbiana contaminante de alimentos de origem animal.

REFERÊNCIAS

- AIDAR, D. S. **A Mandaçaia: biologia, manejo e multiplicação artificial de colônias, com especial referência à *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae).** Ribeirão Preto, SP: Funpec, 162 p., 2011.
- AWUCHI, C. G. Medicinal Plants: The Medical, Food, and Nutritional Biochemistry and Uses. **International Journal of Advanced Academic Research**, v. 5, p. 220–241, 2019.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista brasileira de farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.
- BARTH, O. M.; LUZ, C. F. P. **Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments**, Grana, v. 42, n. 2, p. 121–127, 2003.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BEARTH, A.; COUSIN, M. E.; SIEGRIST, M. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk, and benefit perceptions. **Food Quality and Preference**, v. 38, p. 14–23, 2014.
- BILLING, J.; SHERMAN, P. W. Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. **The Quarterly review of biology**, v. 73, p. 3–49, 1998.
- BONSUCCESSO, J. S.; GLOAGUEN, T. V.; NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, C. A. L. C.; DIAS, F. S. Metals in geopropolis from beehive of *Melipona scutellaris* in urban environments. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 687–694, 2018.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p.16-17, 2000.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da União], Brasília, DF, Seção 1, p. 18, 2001.
- BROMHAM, L.; SKEELS, A.; SCHNEEMANN, H.; DINNAGE, R.; HUA, H. There is little evidence that spicy food in hot countries is an adaptation to reducing infection risk. BRUENING, H.; Abelha Jandaíra. 3a ed. Natal: SEBRAE/ RN, 2006.
- CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 545–556, 2012.

CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Foodborne Germs and Illnesses**. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em: 20 out. 2020.

COSTA-PEREIRA, R. Removal of clay by stingless bees: load size and moisture selection. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 1287-1294, 2014.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4^a ed. - Editora Artmed, 2010.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 571-577, 2005.

DITTMANN, K. K.; CHAUL, L. T.; LEE, S. H. I.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F.; MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; OXARAN, L. G. V. *Staphylococcus aureus* in Some Brazilian Dairy Industries: Changes of Contamination and Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2049, 2017.

EPSTEIN, W. B. T. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**. The Roles and Regulation of Potassium in Bacteria. In: [s.l.]: Academic Press, 2003, v. 75, p. 293–320. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079660303750089>>.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Munique: EUCAST, 112 p., 2020. Disponível em: <www.eucast.org/clinical_breakpoints/> Acesso em Fevereiro de 2020.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 69–75, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FERNANDES, M. F.; QUEIROZ, L. P. Vegetação e flora da Caatinga. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 51-56, 2018.

FERREIRA, B. L.; GONZAGA, L. V.; VITALI, L.; MICKE, G. A.; BAGGIO, D.; OLIVEIRA, A. C.; FETT, C. R. Dataset about Southern-Brazilian geopropolis: Physical and chemical perspectives. **Data in Brief**, v. 29, p. 105109, 2020.

GABRIEL, M. B.; CARNEIRO, M. J.; CAMARGO, R. C. R.; SAWAYA, A. C. H. F. The chemical composition and antioxidant activity of mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) geopropolis varies more due to region than month of collection. **Natural Product Research**, p. 1-5, 2021.

GOKOGLU, N. Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 5, p. 2068–2077, 2019.

HELLWIG, M. The Chemistry of Protein Oxidation in Food. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 47, p. 16742–16763, 2019.

IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** Geneva, ed. 4, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.

JAFFÉ, R.; VEIGA, J. C.; POPE, N. S.; ÉDER, C. M. L.; CARVALHO, C. S.; ALVES, R.; ANDRADE, S. C. S.; ARIAS, M. C.; BONATTI, V.; CARVALHO, A. T.; CASTRO, M. S.; CONTRERA, F. A. L.; FRANCOY, T. M.; FREITAS, B. M.; GIANNINI, T. C.; HRNCIR, M.; MARTINS, C. F.; OLIVEIRA, G.; SARAIVA, A. M.; SOUZA, B. A.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Landscape genomics to the rescue of a tropical bee threatened by habitat loss and climate change. **Evolutionary Applications**, v. 12, n. 6, p. 1164–1177, 2019.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, n. 2, p. e00174-20, 2021.

JONES, J. C.; OLDROYD, B. P. Nest thermoregulation in social insects. **Advances in Insect Physiology**, v. 33, p. 154–185, 2007.

LABUZA, T. P.; DUGAN, L. R. Kinetics of lipid oxidation in foods. **C R C Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, n. 3, p. 355–405, 1971.

LAVINAS, F. C.; MACEDO, E. H. B. C.; SÁ, G. B. L.; AMARAL, A. C. F.; SILVA, J. R. A.; AZEVEDO, M. M. B.; VIEIRA, B. A.; DOMINGOS, T. F. S.; VERMELHO, A. B.; CARNEIRO, C. S.; RODRIGUES, I. A. Brazilian stingless bee propolis and geoprópolis: promising sources of biologically active compounds. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 389-399, 2019.

LHERMIE, G.; GRÖHN, Y. T.; RABOISSON, D. Addressing Antimicrobial Resistance: An Overview of Priority Actions to Prevent Suboptimal Antimicrobial Use in Food-Animal Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2114, 2017.

LUND, M. N.; HEINONEN, M.; BARON, C. P.; ESTÉVEZ, M. Protein oxidation in muscle foods: A review. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 1, p. 83–95, 2011.

MANAFI, M; KNEIFEL, W. [A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water]. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin = International journal of hygiene and environmental medicine**, v. 189, n. 3, p. 225–234, 1989. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/2697207>>. Acesso em Outubro de 2020.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Influence of salt on lipid oxidation in meat and seafood products: A review. **Food Research International**, v. 94, p. 90–100, 2017.

MATURIN, L.; PEELER, J. T. **Aerobic Plate Count**. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> Acesso em Outubro de 2020

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. MIGUEL, M. G.; FIGUEIREDO, A. C. **Propolis and Geopropolis Volatiles BT - Bee Products - Chemical and Biological Properties**. In: ALVAREZ-SUAREZ, José M (Org.). Cham: Springer International Publishing, 2017, p. 113–136. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_6>.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

ODEYEMI, O. A.; ALEGBELEYE, O. O.; STRATEVA, M.; STRATEV, D. Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 311–331, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>>.

OLIVEIRA, K. N.; PAULA-LEITE, M. C.; FAQUINELLO, P.; CARVALHO, C. A. L.; LINO-LOURENÇO, D. A.; SAMPAIO, R. B.; SANTOS, E. B. Genetic parameters for production and biometrics traits in honey bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* LEPELETIER. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, p. 819–826, 2015.

PARPINELLI, R. S. .; LIMA, E. G. de .; ANJO, F. A.; ALMEIDA, L. de M. .; MARÇO, P. H. .; TOLEDO, V. de A. A. de . Microbiological characteristics of meliponine honey marketed in the State of Paraná – Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e6710111381, 2021.

PETRUZZI, L.; CORBO, M. R.; CAMPANIELLO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; BEVILACQUA, A. Antifungal and Antibacterial Effect of Propolis: A Comparative Hit for Food-Borne Pseudomonas, Enterobacteriaceae and Fungi. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 559, 2020.

QUEZADA-EUÁN, J.; NATES-PARRA, G.; MAUÉS, M. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; ROUBIK, D. Economic and cultural value of stingless bees (Hymenoptera: Meliponini) among ethnic groups of tropical America. **Sociobiology**, v. 65, n. 4, p. 534–557, 2018.

RODRIGUES, C. S.; FERASSO, D. C.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; GRANDO, R. C.; TREICHEL, H.; COELHO, G. C.; MOSSI, A. J. Quality of Meliponinae honey: Pesticides residues, pollen identity, and microbiological profiles. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 4, p. 39–45, 2018.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chemistry Central journal**, v. 5, n. 1, p. 27, 2011.

SCHAR, D.; SOMMANUSTWEECHAI, A.; LAXMINARAYAN, R.; TANGCHAROENSATHIEN, V. Surveillance of antimicrobial consumption in animal production sectors of low- and middle- income countries: Optimizing use and addressing antimicrobial resistance. **Plos one**, p. 1–9, 2018.

SEVEN, P. T.; SEVEN, I.; BAYKALIR, B. G.; MUTLU, S. I.; SALEM, A. Z. M. Nanotechnology and nano-propolis in animal production and health: an overview. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 4, p. 921–930, 2018.

SILVA, E. C. A. Preparo do extrato de própolis legal. **Mensagem Doce**. São Paulo, n. 70, 2003.

SILVA, G. R.; PEREIRA, F. M.; SOUZA, B. A.; LOPES, M. T. R.; CAMPELO, J. E. G.; DINIZ, F. M. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 299-308, 2014.

SILVA, M. C.; LOPES-NETO, J. P.; RIBEIRO, N. L. Correlação de parâmetros biométricos e produtivos em colônias de *Melipona scutellaris*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 72, n. 2, p. 637-640, 2020.

SILVA, P. R.; SILVA, T. M. G.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S. Palynological origin, phenolic content and antioxidant properties of geopropolis collected by mandaçaia (*Melipona mandacaia*) stingless. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 1, p. 246-252, 2020.

SONG, M. R.; IM, M. Moderating effects of food type and consumers' attitude on the evaluation of food items labeled "additive-free". **Journal of Consumer Behaviour**, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2018.

SOUZA, S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, T. M. S. Composition and Antioxidant Activity of Geopropolis Collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) Bees. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, 2013/07/14. v. 2013, p. 801383, 2013.

SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. G.; SILVA, E. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Characterisation of phenolic compounds by UPLC-QTOF-MS/MS of geopropolis from the stingless bee *Melipona subnitida* (jandaíra). **Phytochemical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 549–558, 2018.

SUREK, M.; FACHI, M. M.; COBRE, A. F.; OLIVEIRA, F. F.; PONTAROLO, R.; CRISMA, A. R.; SOUZA, W. M.; FELIPE, K. B. Chemical composition, cytotoxicity, and antibacterial activity of propolis from Africanized honeybees and three different Meliponini species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 269, p. 113662, 2021.

TORRES, A. R.; SANDJO, L. P.; FRIEDEMANN, M. T.; TOMAZZOLI, M. M.; MARASCHIN, M.; MELLO, C. F.; SANTOS, A. R. S. Chemical characterization, antioxidant and antimicrobial activity of propolis obtained from *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula* stingless bees. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 51, n. 6, 2018.

TOURNAS, V.; STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B.; KOCH, H. A.; BANDLER, R. **Yeasts, molds and mycotoxins**. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins> Acesso em Outubro de 2020.

VILLAS-BÔAS, J. K. **Manual de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas sem Ferrão**. 2. ed. Brasília – DF, Instituto Sociedade, População e Natureza, 2018. 212 p.

YONG, H.; LIU, J. Active packaging films and edible coatings based on polyphenol-rich propolis extract: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2106–2145, 2021.

CAPÍTULO IV
O MEL MATURADO DA ABELHA JANDAÍRA

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar o mel fresco maturado da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida*) do semiárido brasileiro. O trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira consistiu na caracterização de 30 amostras de méis frescos de *M. subnitida*. A segunda etapa do estudo consistiu na caracterização do processo de maturação do mel avaliando as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante o processo de maturação. Os únicos microrganismos com crescimento detectado nas amostras de mel *in natura* foram os bolores e leveduras com valores de contagem microbiana variando entre $< 1,18$ e $4,85 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Nas amostras *in natura* foram encontrados valores médios de umidade $26,5 \text{ g/100 g}$; pH 3,5; acidez livre $36,14 \text{ mEq/kg}$; hidroximetilfurfural $6,15 \text{ mg/kg}$; açúcares redutores $67,58 \text{ g/100 g}$; sacarose aparente $2,89 \text{ g/100 g}$; sólidos insolúveis em água $0,1 \text{ g/100 g}$, cinzas $0,27 \text{ g/100 g}$ e 44 % das amostras analisadas apresentaram coloração branco d'água (0 a 8 mm Pfund). Antes de passar pelo processo de maturação o mel de abelha jandaíra apresentou presença de bolores e leveduras, $3,6 \pm 0,4 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, bactérias mesófilas totais $4,1 \pm 0,2 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ e bactérias ácido lácticas $4,3 \pm 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, porém após primeiro mês de maturação a presença desses microrganismos nas amostras foi praticamente zero ($< 1,2$ e $< 1,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Observou-se que o pH do mel é uma importante medida para acompanhar as alterações nele ocorrem durante o processo de maturação. Durante os 120 dias do processo o pH se tornou mais ácido gradativamente, enquanto o teor de acidez se elevava ($r = -0,945$; $p < 0,001$), o teor de açúcares redutores reduzia ($r = 0,962$; $p < 0,001$) e o mel se tornava mais denso ($r = -0,861$; $p < 0,001$). A forte correlação entre a queda do pH, aumento da acidez livre, diminuição dos açúcares redutores e aumento da densidade do mel são um forte indicativo que parte dos processos de maturação são oriundos da microbiota intrínseca que metaboliza açúcares simples e os transforma em compostos ácidos voláteis que diminuem o pH do mel, aumentam sua acidez e densidade. No início da maturação o mel de jandaíra apresentou sabor doce suave, aroma adocicado e de consistência líquida. Após 120 dias do processo de maturação, o mel apresentou características organolépticas diferenciadas, aroma ácido suave, sabor agridoce e consistência líquida inalterada. A cor do mel não sofreu alterações visíveis a olho nu durante o período de maturação coloração branco (17 a 28 mm Pfund). O mel *in natura* e o mel maturado de abelha jandaíra apresentaram-se como alimentos seguros ao consumo humano, sem presença de microrganismos patogênicos nem de compostos tóxicos. O mel maturado da abelha jandaíra apresentou-se como um produto de características físico-químicas e organolépticas diferenciadas a qual lhe agregam valor de mercado.

Palavras-chave: Processos fermentativos; Microrganismos; Meliponini

ABSTRACT

This work aimed to characterize the fresh and matured honey of the Jandaíra bee (*Melipona subnitida*) from the Brazilian semiarid region. The work was carried out in two stages. The first one consisted in the characterization of 30 samples of fresh honeys from *M. subnitida*. The second stage of the study consisted of analyzing the physical-chemical, microbiological and sensory characteristics during the honey maturation process. The results showed the only microorganisms detected in fresh honey samples were molds and yeasts with microbial count values ranging between $<1,18$ to $4,85 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$. In the fresh samples, average values of humidity were found: $26,5 \text{ g/100 g}$; pH 3,5; free acidity $36,14 \text{ mEq/kg}$; hydroxymethylfurfural $6,15 \text{ mg / kg}$; reducing sugars $67,58 \text{ g/100 g}$; apparent sucrose $2,89 \text{ g/100 g}$; water insoluble solids $0,1 \text{ g/100 g}$, ash $0,27 \text{ g/100 g}$ and 44% of the analyzed samples showed water white color (0 to 8 mm Pfund). At the initial time of maturation, honey presented molds and yeasts, $3,6 \pm 0,4 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$, total mesophilic bacteria $4,1 \pm 0,2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$ and lactic acid bacteria $4,3 \pm 0,1 \text{ Log}_{10} \text{ CFU/g}$, but after the first month of maturation, the presence of these microorganisms in the samples was almost zero ($<1,2$ and $<1,5 \text{ Log}_{10} \text{ CFU / g}$). It was observed that the pH of honey is an important measure to identify the changes that occur during the maturation. During the 120 days of the process, the pH gradually became more acidic, while the acidity content increased ($r = -0,945$; $p < 0,001$), the reducing sugar content decreased ($r = 0,962$; $p < 0,001$) and honey it became denser ($r = -0,861$; $p < 0,001$). After 120 days of the maturation process, the honey showed an acidic aroma, bittersweet flavor, the color and the liquid consistency were unchanged. The honey color did not change visibly during the maturation period, white color (17 to 28 mm Pfund). Fresh honey and mature honey from *M. subnitida* presented themselves as safe food for human consumption, without the presence of pathogenic microorganisms or toxic compounds. The matured honey of the jandaíra bee presented itself as a product with different physical-chemical and organoleptic characteristics which add market value to it.

Keywords: Fermentation processes; Microorganisms; Meliponini

1 INTRODUÇÃO

A Jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) é uma abelha sem ferrão que ocorre na região semiárida do nordeste brasileiro (ZANELLA; MARTINS, 2003; CARVALHO; ZANELLA, 2017). Segundo Koffler *et al.*, (2015) essa espécie é utilizada com frequência na meliponicultura regional e suas colônias são amplamente criadas e multiplicadas para a produção de mel.

O mel da abelha jandaíra é um alimento de cor, aroma, sabor e consistência únicos muito apreciado pelo mercado consumidor da região nordeste do Brasil. Geralmente caracteriza-se como de sabor meio ácido, com textura fina, pouco viscoso, de cor clara e com aroma característico (NOGUEIRA-NETO, 1997; DANTAS *et al.*, 2020).

O mel da abelha jandaíra apresenta características peculiares que o distinguem do mel de abelha africanizada (*Apis mellifera*), principalmente em relação à umidade, sólidos insolúveis, acidez e açúcares redutores (SILVA; PINHEIRO, 2017).

O teor de umidade do mel de abelha *M. subnitida* um dos principais fatores que o distinguem do mel de abelha melífera amplamente comercializado. Devido ao teor de umidade elevado do mel de jandaíra ele caracteriza-se por ser mais líquido e menos viscoso. O mel de abelha jandaíra também apresenta outras características distintas como menor teor de açúcares e pH ácido (MONTE *et al.*, 2013; SILVA; PINHEIRO, 2017).

A produção do mel em si também é singular, em média uma colmeia de abelha jandaíra pode atingir a produção ótima de 1,8 L de mel ao ano. Devido à baixa produção às suas propriedades medicinais, o mel de abelha jandaíra possui alto valor agregado (KOFFLER *et al.*, 2015).

No estado do Rio Grande do Norte, a venda do mel de abelha jandaíra proporciona renda para pequenos produtores. A comercialização do mel de jandaíra representa uma excelente fonte de lucro, devido ao elevado valor de mercado do produto e ao baixo investimento de criação (AIRES-NETO; CARVALHO, 2017).

Apesar de ser considerado um alimento resistente, no mel de jandaíra também podem ocorrer processos de deterioração. Ainda que alguns fatores intrínsecos sejam limitantes ao crescimento de microrganismos patogênicos. Algumas cepas de microrganismos osmofílicos podem se desenvolver descontroladamente e deteriorar esse alimento (DIAS *et al.*, 2014).

O teor de umidade do mel é um ponto chave para sua vida útil. Em geral, o alto teor de umidade favorece que ocorra o processo de fermentação descontrolada do mel, o que pode ocasionar deterioração

e perda de sabor, levando à queda de qualidade do produto (PÉREZ-ARQUILLUÉ *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 1999).

Métodos de manejo, colheita e beneficiamento que não obedeçam às boas práticas de fabricação associadas à umidade elevada encontrada no mel das abelhas sem ferrão podem favorecer a proliferação de microrganismos que reduzem a vida de prateleira e tornam-no impróprio para o consumo humano (ALVES *et al.*, 2011).

Algumas técnicas de conservação são indicadas para a preservação do mel. Dentre os métodos aplicados destacam-se: refrigeração logo após a colheita; desidratação, que resulta na redução da umidade; fermentação controlada do mel colhido pela sua própria microbiota, provocando um aumento da acidez; e processo térmico de pasteurização, visando à redução da carga microbiana (DIAS *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018).

Porém, os métodos conservativos aplicados raramente são realizados corretamente e o produto não passa por uma avaliação adequada antes de ser comercializado (CAMARGO *et al.*, 2017). Um método de conservação que vem ganhando destaque para a preservação do mel é a maturação (fermentação controlada do mel). A maturação do mel das abelhas sem ferrão é uma metodologia que consiste em controlar o processo de fermentação natural que ocorre no mel após o processo de extração (VILLAS-BÔAS, 2018).

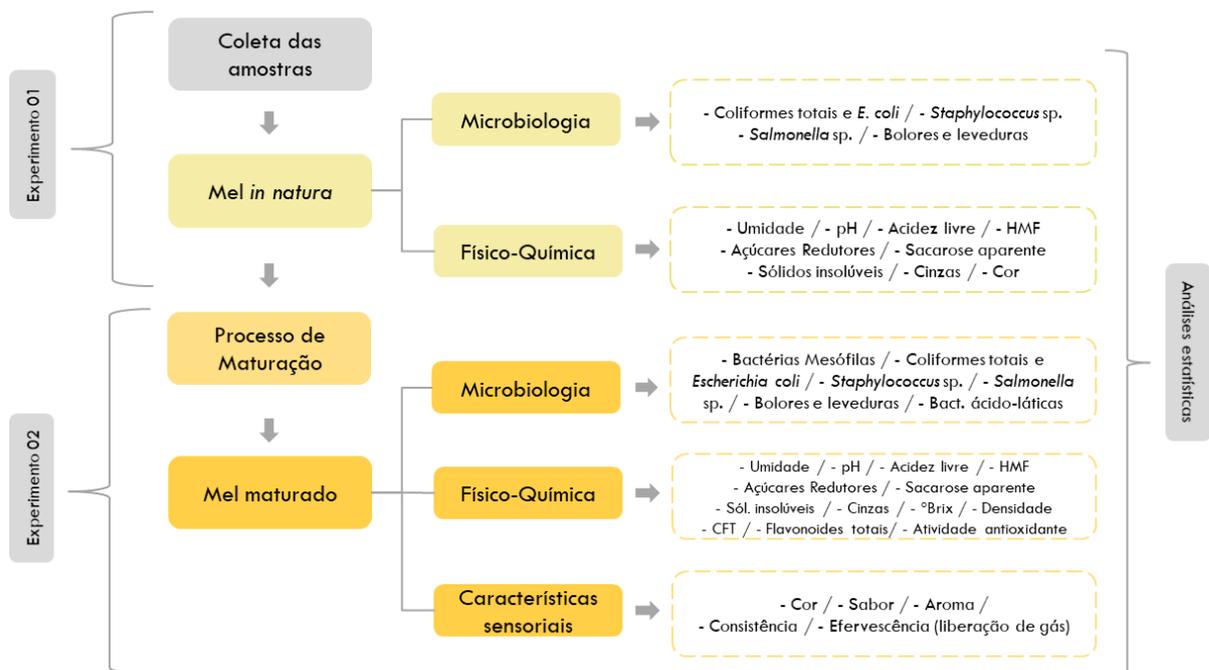
O processo de maturação do mel de abelhas sem ferrão está ligado ao conceito de que nem todo mel fermentado é mel estragado. Quando extraído através de práticas higiênicas e submetido a um período de maturação que dura em média de quatro a seis meses, o mel tem sua vida de prateleira aumentada em dois anos. No mel das abelhas sem ferrão, a maturação incrementa as características sensoriais do produto e é utilizada para preservação, pois evita o desenvolvimento de patógenos e microrganismos deteriorantes (CAMARGO *et al.*, 2017; VILLAS-BÔAS, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2018).

O mel maturado da abelha jandaíra já é produzido e comercializado em pequenas escalas no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Este produto é extremamente valorizado pelo mercado consumidor. Porém o processo de maturação realizado ainda ocorre de forma artesanal e empírica e suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais permanecem não esclarecidas. Diante desta problemática e do fato que não existem estudos publicados que descrevam o processo de maturação do mel de abelha jandaíra. Este trabalho objetivou caracterizar, otimizar e padronizar o método de maturação (fermentação controlada) do mel da abelha Jandaíra (*Melipona subnitida*) do semiárido brasileiro.

2 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado em duas etapas e foi desenvolvido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). A primeira etapa do estudo consistiu em coletar e caracterizar os insumos utilizados para a produção do mel fermentado da abelha jandaíra da região semiárida. A segunda etapa do estudo consistiu em desenvolver e caracterizar o processo de maturação do mel avaliando as características físico-químicas e microbiológicas do produto antes, durante e ao final do processo de maturação (Figura 1).

Figura 9. Fluxograma experimental simplificado.



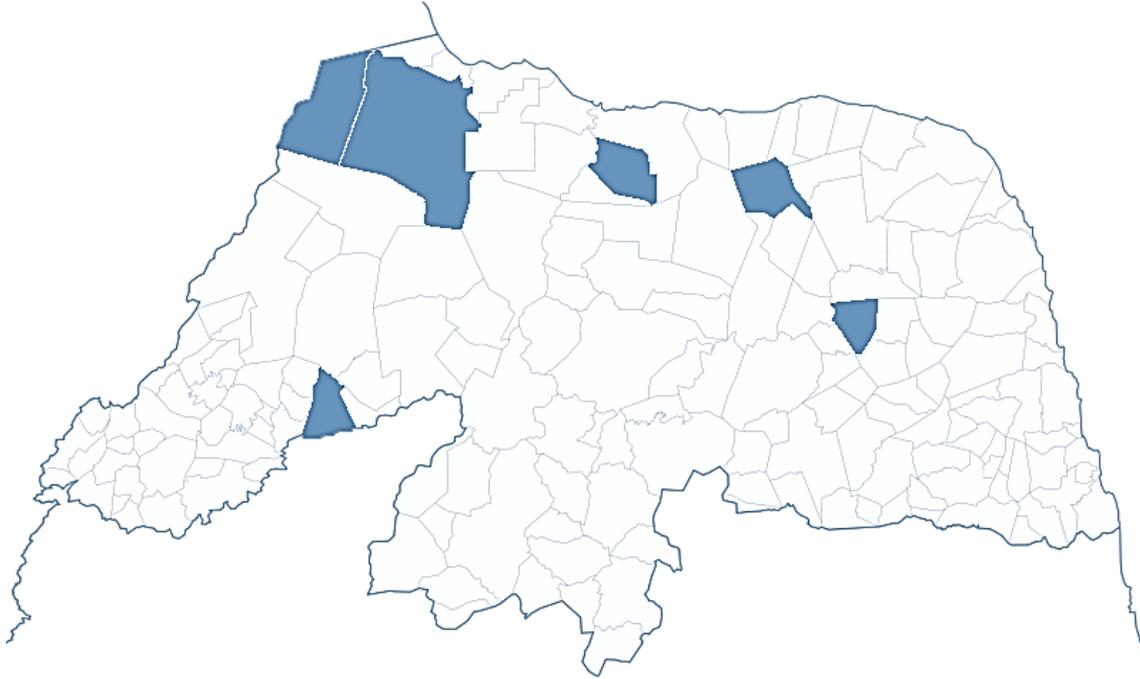
HMF: Hidroximetilfurfural; CFT: Compostos fenólicos totais; Fonte: Kewen Santiago.

2.1 EXPERIMENTO 1 – Caracterização do Mel fresco de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.

Para caracterizar o mel utilizado como matéria prima para a produção do mel maturado foram coletadas 30 amostras de mel de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) no período entre agosto e novembro de 2019 provenientes de municípios da região semiárida do estado do

Rio Grande do Norte, Brasil. As amostras foram provenientes de zona rural e de zona urbana dos municípios: Baraúna, Jandaíra, Mossoró, Patu, Pendências e Riachuelo (Figura 2).

Figura 2. Municípios do estado do Rio Grande do Norte onde foram coletadas as amostras do mel de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).



Fonte: Kewen Santiago.

Foram coletados aproximadamente 200 mL de amostra de mel de cada colmeia. As amostras foram coletadas com o auxílio de seringas estéreis de 5 mL, em seguida foram acondicionadas em coletores universais estéreis e foram armazenadas sobre refrigeração a $8\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ até serem analisadas quanto a suas características físico-químicas e microbiológicas. As análises descritas a seguir foram realizadas em duplicata.

2.1.1 – Análise das características do mel de abelha jandaíra *in natura*

Foram analisadas as características físico-químicas (Umidade, pH, Acidez livre, Hidroximetilfurfural - HMF, Açúcares redutores, Sacarose aparente, sólidos insolúveis em água, cinzas e cor) e microbiológicas (Coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp., bolores e leveduras) dos méis coletados.

2.1.1.1 - Umidade

O teor de umidade do mel foi avaliado através de um refratômetro digital portátil da marca Atago, modelo PAL-22S. Foram seguidas as instruções do fabricante do aparelho. Os resultados serão expressos em gramas de umidade a cada 100 gramas de mel.

2.1.1.2 pH

Para avaliar o pH foram pesadas 10 gramas de mel, essa amostra foi diluída em 75 mL de água destilada, em seguida o pH foi aferido através de pHmetro de bancada, previamente calibrado (IAL, 2008).

2.1.1.3 Acidez livre

A determinação da acidez livre foi executada de acordo com o protocolo estabelecido pelo Instituto Adolfo Lutz, (2008). Foram pesadas 10 gramas de mel e diluídas em 75 mL de água destilada. Após aferido o pH, as amostras foram tituladas com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 N até a neutralização (pH = 8,5). Para calcular os valores da acidez livre foi utilizado a fórmula. Acidez livre = (mL de NaOH utilizado - mL branco) x 50/massa da amostra. Os resultados foram expressos em mEq/Kg.

2.1.1.4 Hidroximetilfurfural – HMF

Para a análise de hidroximetilfurfural foi seguido o protocolo estabelecido pelo Instituto Adolfo Lutz, 2008. Uma amostra de 5 g de mel foi diluída em 25 mL de água em um balão volumétrico de 50 mL. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio tri-hidratado (Carrez I) e o balão foi agitado, logo em seguida adicionou-se 0,5 mL de solução de acetato de zinco (Carrez II) no balão volumétrico. Após a adição das soluções, o volume do balão foi completo com água destilada, a solução foi filtrada, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Em tubos de ensaio foram colocados 5 mL de água destilada mais 5 mL do filtrado (amostra) e no outro tubo 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2 % mais 5 mL de amostra (referência). Ambos os tubos foram agitados vigorosamente em vortex durante 3 minutos, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro em absorvância de 284 e 336

nm. O valor de HMF foi determinado de acordo com a fórmula abaixo. Os resultados foram expressos em mg/Kg.

$$\text{HMF (mg/kg)} = (\text{Abs284} - \text{Abs336}) \times 149,7 \times 5 / \text{peso da amostra}$$

2.1.1.5 Açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada seguindo o protocolo modificado por Lane e Eynon (IAL, 2008). De início foram padronizadas as soluções de Fehling A e Fehling B utilizando a solução-padrão de açúcar invertido.

Para o procedimento duas gramas de amostra foram diluídas em água destilada num balão volumétrico de 200 mL. Em seguida foi realizada uma segunda diluição na qual 50 mL da solução anterior foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL. Em seguida foram pipetados 5 mL de cada solução Fehling (A e B) em um balão de fundo chato de 250 mL, logo após foram adicionados sete mL de água destilada. Na bureta colocou-se a segunda solução de mel diluída, 15 mL desta solução também foram adicionados a um balão de fundo chato. O balão foi posto em chapa aquecedora e quando seu conteúdo líquido atingiu ebulição moderada, foi adicionado 1 mL de solução de azul de metileno ao balão. A titulação foi finalizada entre os três minutos seguintes após a adição do azul de metileno. A titulação é completada quando se visualiza a descoloração do indicador.

O volume gasto da solução de mel (VmL) nesta primeira titulação foi anotado e a titulação foi repetida utilizando 5 mL de cada solução de Fehling, (25 - VmL) de água e o volume da solução diluída de mel gasto na titulação preliminar menos 1,5 mL. Em seguida, repetiu-se a titulação como dito anteriormente (VmL₂). O teor de açúcares redutores dos méis foi determinado de acordo com a fórmula abaixo. Os resultados foram expressos em g/100g.

$$\text{Açúcares Redutores} = 2 \times 1000 / (\text{Massa da amostra em gramas}) \times (\text{VmL}_2)$$

2.1.1.6 Sacarose aparente

Para a análise da sacarose aparente foi utilizado o método modificado de Lane e Eyon (IAL, 2008). Foram medidos 50 mL da solução de mel obtida na análise de açúcares redutores para um balão volumétrico de 100 mL. Nesse balão foram adicionados 25 mL de água e ele foi colocado em banho-maria a 65 ° C. Após a retirada do banho adicionou-se 10 mL de solução de ácido clorídrico 5 M. Depois que a solução esfriou em temperatura ambiente, foi realizada a neutralização da solução com hidróxido de sódio 5 M. Após a neutralização, o volume do balão

foi completo com água destilada. Após o preparo da solução de açúcares redutores totais, foi realizada a titulação de acordo com o item 2.1.1.5. O teor de sacarose aparente dos méis foi determinado de acordo com a fórmula abaixo. Os resultados foram expressos em g/100g.

$$\text{Sacarose Aparente} = (\text{Açúcares redutores Totais} - \text{Açúcares Redutores}) \times 0,95$$

2.1.1.7 Sólidos insolúveis em água

Para a análise de sólidos insolúveis seguiu-se a metodologia sugerida pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL). Foram pesadas 20 gramas da amostra de mel, ela foi diluída com água a 80 °C e filtrada em papel filtro (previamente seco em estufa a 135 °C por uma hora e dessecado por 35 minutos e pesado). Após a filtração o papel foi devolvido a estufa, a 135 °C/1h, e foi dessecado/35 minutos e pesado. Para calcular o teor de sólidos insolúveis em água, fez-se a diferença do peso do papel, dividido pela massa da mostra, o valor da divisão foi multiplicado por 100. Os resultados foram expressos em g/100g.

2.1.1.8 Cinzas

Para determinação das cinzas foi seguido o protocolo estabelecido pelo IAL (2008) com modificações. Inicialmente os cadinhos foram mantidos em mufla a 600 °C por uma hora e em seguida colocados em dessecador por 30 minutos. Foi aferido o peso dos cadinhos e neles pesou-se 5 gramas do mel. Logo após os cadinhos foram colocados em chapa aquecedora a 360 °C por quatro horas e depois para mufla a 600 °C por quatro horas, depois foram mantidos em dessecador por 30 minutos, para serem pesados novamente. A porcentagem de cinzas foi determinada pela seguinte equação. Os resultados foram expressos em g/100g.

$$\text{Cinzas} = (\text{Peso do cadinho com cinzas} - \text{Peso do cadinho} / \text{Peso da amostra}) \times 100$$

2.1.1.9 Cor

A metodologia utilizada para a análise de cor foi a baseada nos diferentes graus de absorção de luz de vários comprimentos de onda, dependendo dos constituintes presentes na amostra de mel (USDA, 1985). A classificação da cor dos méis foi realizada com auxílio de um fotômetro Hanna, modelo HI 83221. Foi realizado a leitura das amostras de mel a uma absorbância de 560 nm, utilizando como branco a glicerina pura. A leitura encontrada foi posteriormente transformada em cor pela escala de Pfund, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Escala Pfund para classificação de cores de méis.

Coloração	Escala de Pfund
Branco d'água	0 a 8 mm
Branco extra	8 a 17 mm
Branco	17 a 34 mm
Âmbar extra claro	34 a 50 mm
Âmbar claro	50 a 85 mm
Âmbar	85 a 114 mm
Âmbar escuro	> 114 mm

Fonte: (USDA, 1985).

2.1.2 Análise das características microbiológicas do mel de abelha jandaíra *in natura*

Pesquisou-se nas amostras de mel os microrganismos: Coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp. e bolores e leveduras, no laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-Rn.

Inicialmente foram pesadas 25 gramas de cada amostra de mel. Em seguida esse material foi diluído em 225 mL de água peptonada estéril (diluição 10^{-1}). Em seguida foram realizadas diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo água peptonada estéril até alcançar a diluição 10^{-3} . As diluições produzidas foram utilizadas para todas as análises microbiológicas avaliadas. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.1.2.1 Detecção e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para detecção e contagem de coliformes totais e *E. coli* em amostras de mel, foi seguida a metodologia estabelecida por Manafi e Kneifel (1989) com modificações. As diluições 10^{-1} a 10^{-3} obtidas foram semeadas pela técnica *spread plate* em placas de ágar cromogênico *Hicoliform* para detecção rápida de coliformes e *E. coli*. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 ° C. Após o período de incubação foram contadas as unidades formadoras de colônia características de coliformes totais (colônias azul-esverdeadas). Para detecção de *E. coli*, adicionou-se 3 gotas de reagente de Kovacs nas colônias consideradas suspeitas. Foram consideradas positivas para *E. coli* as colônias que apresentaram fenótipo avermelhado após 2 minutos do uso do reagente de Kovacs. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

2.1.2.2 Contagem de *Staphylococcus* sp.

Para contagem de *Staphylococcus* sp. em amostras de mel foi seguida a metodologia sugerida por Tallent *et al.* (1998) com adaptações. Foram preparadas placas de ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito a 1%. Inoculou-se nas placas 100 µl das diluições 10^{-1} a 10^{-3} pela técnica *spread plate*. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48h. Foram consideradas para contagem as colônias pretas, brilhantes, convexas, cercadas por zona clara e/ou uma borda opaca (colônias características de *Staphylococcus* sp). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

2.1.2.3 Detecção de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp. foi seguido o protocolo ISO 6579:2007 com adaptações. A diluição 10^{-1} de cada amostra de mel foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 20 horas. Em seguida alíquotas dessa diluição foram transferidas para os caldos Rappaport-Vassiliadis, Tetracionato e Selenito-Cistina por 24 horas a 41 °C em banho-maria. Posterior ao período de incubação, com o auxílio de alças de transferência descartáveis, os caldos foram repicados para placas de Petri preparadas previamente com ágar manitol lisina violeta cristal verde brilhante (MLCB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). O material foi incubado a 37 °C por 24 horas. As colônias características foram repicadas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) e incubadas por 24 horas a 37 °C. As amostras consideradas positivas (LIA de coloração inalterada e TSI com coloração rosa no ápice, amarela no meio e preta no fundo) foram repicadas para tubos com ágar uréia e incubadas a 37 °C por 24 horas. As amostras que não apresentaram reação de clivagem da ureia (substrato rosado) foram consideradas com presença de *Salmonella* sp. em 25 g de mel.

2.1.2.4 Contagem de Bolores e Leveduras

Para contagem de bolores e leveduras de mel foi seguida a metodologia proposta por Tournas *et al.* (1998). Foram preparadas placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico. As placas foram inoculadas através da técnica de *spread plate* com 100 µl das diluições obtidas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e foram incubadas a 25 °C durante cinco dias. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.2 EXPERIMENTO 2 – Produção e caracterização do mel maturado de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte.

Para a produção de Mel maturado de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) foram colhidas quatro amostras de 500 mL de mel fresco em diferentes pontos da zona rural e da zona urbana no município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil (5°09'41.5"S 37°21'35.0"W). As amostras foram coletadas no mês de agosto de 2020 seguindo todas as recomendações de higiene necessárias. As amostras recém-colhidas foram acondicionadas em recipientes de vidro estéreis de 500 mL selados com tampa de rosca. Após a coleta as amostras foram enviadas ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN.

2.2.1 Produção do mel de abelha jandaíra maturado

A metodologia utilizada para a produção do mel maturado foi recomendada e ensinada pelos produtores rurais que utilizam a técnica para produzir e comercializar o mel maturado de abelha jandaíra. A técnica foi escolhida com o intuito de caracterizar o processo de maturação e o produto finalizado de acordo com a forma como ele é produzido e comercializado tradicionalmente no estado do Rio Grande do Norte pelos meliponicultores.

2.2.1.1 Construção e caracterização de um fermentador para maturação de mel de jandaíra

O modelo de fermentador desenvolvido para o experimento foi escolhido por ser empregado rotineiramente pelos meliponicultores da região semiárida para maturação artesanal do mel de abelhas sem ferrão (Figura 3).

Figura 3. Fermentador artesanal para maturação de mel abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke).



(A) galão de polipropileno; Airlock (B); Torneira para envase (C). Fonte: Kewen Santiago.

A estrutura do fermentador foi composta por um galão de polipropileno, atóxico com volume máximo de 3,6 L (Figura 2A). O modelo de galão escolhido é utilizado de forma padrão para estocagem de mel e outros alimentos. A tampa desse recipiente possui fechamento hermético, impossibilitando a entrada de pragas e contaminantes que possam interferir na qualidade do produto.

Foi colocado no topo do fermentador um *airlock* tipo S com o intuito de permitir a saída do gás CO₂ (formado pela fermentação) e evitar que o ar contaminado do ambiente retornasse para dentro do fermentador (Figura 2B). O volume interno do *airlock* foi preenchido com água destilada previamente esterilizada.

Na base do fermentador foi colocada uma torneira para bebedouro com o intuito de facilitar a colheita das amostras ao longo do período de maturação e evitar interferências no processo (Figura 2C). Os meliponicultores utilizam esse mecanismo da torneira para facilitar o envase do mel a ser comercializado após o período de maturação.

2.2.1.2 Processo de Maturação do mel de abelha jandaíra

As quatro amostras de mel, coletadas anteriormente, foram acondicionadas e homogeneizadas de maneira asséptica dentro do fermentador artesanal previamente esterilizado por radiação ultravioleta. O fermentador foi hermeticamente fechado e colocado em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 30 °C ± 1 °C por 90 dias para maturação. Foram

recolhidas alíquotas de 500 mL do mel no tempo inicial, 30, 60, 90 E 120 dias após início da maturação. As alíquotas obtidas foram submetidas a análises físico-químicas (Umidade, pH, Acidez livre, Hidroximetilfurfural, Açúcares redutores, Sacarose aparente, sólidos insolúveis em água, cinzas, cor, °Brix, densidade, compostos fenólicos totais, flavonoides totais, Capacidade antioxidante), análises microbiológicas (Coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp., bolores e leveduras, Contagem de bactérias mesófilas totais, Contagem de lactobacilos totais) e análises sensoriais (cor, sabor, aroma, consistência, produção e liberação de gás).

2.2.2 Análises das características físico-químicas e microbiológicas do mel de abelha jandaíra durante o processo de maturação

As análises de Umidade, pH, Acidez livre, HMF, Açúcares redutores, Sacarose aparente, sólidos insolúveis em água, cinzas e cor foram executadas conforme metodologia utilizada para caracterização do mel *in natura* de abelha jandaíra no item 2.1.1. As análises microbiológicas de Coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp., bolores e leveduras foram realizadas conforme descrito no item 2.1.2. As demais análises foram realizadas conforme os protocolos a seguir. Todas as análises foram realizadas em quintuplicata.

2.2.2.1 Determinação de sólidos solúveis totais (° BRIX)

Com o auxílio de um refratômetro digital Milwaukee modelo MA871 foi aferido o teor de sólidos solúveis totais das amostras de mel. Foram seguidas as recomendações disponibilizadas pelo fabricante. Água destilada foi utilizada como branco. Os resultados foram expressos em graus brix (°Bx).

2.2.2.2 Densidade

Para calcular a densidade do mel foi seguido o protocolo sugerido pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). De início aferiu-se, em balança analítica de precisão, a massa do picnômetro vazio; em seguida colocou-se água destilada no picnômetro até marcação indicada e anotou-se a massa do picnômetro mais a água. Logo após, foi colocada a amostra de mel no picnômetro

previamente seco e limpo e sua massa foi aferida. O valor da densidade do mel (D_{mel}) foi calculado através da fórmula a seguir. Os resultados foram expressos em g/ml.

$$D_{mel} = \frac{\text{Massa do picnômetro com mel} - \text{massa do picnômetro vazio}}{\text{Massa do picnômetro com água} - \text{massa do picnômetro vazio}}$$

2.2.2.3 Compostos Fenólicos Totais

A quantificação do teor de compostos fenólicos totais em mel de abelha jandaíra foi realizada conforme descrito por Meda et al. (2005) com adaptações. Foram pesadas em um becker 5 gramas de mel, em seguida o conteúdo do béquer foi diluído com 20 ml de água destilada e a solução obtida foi transferida para um balão volumétrico de 50 ml e aferiu-se o menisco. Da solução produzida foram colocadas alíquotas de 500 μ l em tubos de ensaio e cada alíquota foram misturadas com 2,5 ml de solução do reagente Folin-Ciocalteau (0,2 N) e agitou-se os tubos vigorosamente por 30 segundos. Após 5 minutos de descanso, foram adicionados em cada tubo 2 ml de solução de carbonato de sódio (75 g/L), em seguida agitou-se vigorosamente por 30 segundos. Os tubos foram deixados em repouso e ao abrigo da luz por duas horas. Em seguida mediu-se com o auxílio de um espectrofotômetro a absorbância a 760 nm de cada tubo, água destilada foi utilizada como branco. Para os cálculos do teor de compostos fenólicos totais, foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico (20 a 200 mg/L). Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (mg EAG)/L de mel.

2.2.2.4 Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais das amostras de mel foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Meda et al. (2005) com modificações. Foram pipetadas e dispostas em tubos de ensaio alíquotas de 2 ml da solução de mel previamente preparada no item 2.2.2.3. Em seguida em cada tubo foi adicionado 2 ml de solução de cloreto de alumínio a 2%, os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos. Após 10 minutos de descanso, absorbância foi mensurada a 415 nm utilizando como branco a solução de mel + água destilada (1:1). Para determinar o teor de flavonoides totais na amostra, uma curva de quercetina (5 a 50 mg/L) foi utilizada como padrão. O teor de flavonoides foi expresso em mg de quercetina (mg EQ)/L de mel.

2.2.2.5 Capacidade antioxidante

A análise da capacidade antioxidante do mel de jandaíra foi avaliada de acordo com o protocolo sugerido por Meda et al. (2005) com modificações. O método objetiva identificar o potencial de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) por substâncias antioxidantes. A técnica baseia-se no princípio de que o mel, quando rico em substâncias antioxidantes, ao entrar em contato com a solução de DPPH causa alterações colorimétricas na solução de DPPH que pode ser mensurada por espectrofotometria. Quanto menor o valor de absorvância detectado, maior é o teor de antioxidantes presente na amostra analisada.

De início foram preparadas soluções de mel nas concentrações 100, 80, 60, 40 e 20 mg/ml. Em seguida, Alíquotas de 1 ml de cada diluição preparada foi adicionada a tubos de ensaio contendo 2,5 ml de solução metanólica de DPPH. Os tubos foram agitados delicadamente e deixados para descansar por 15 minutos ao abrigo da luz. Em seguida foi mensurada absorvância das amostras a 517 nm utilizando como branco metanol. Foi medido também a absorvância da solução metanólica de DPPH utilizada para servir como controle. A atividade antioxidante dos extratos foi obtida considerando o percentual de inibição do radical DPPH, calculado conforme fórmula a seguir.

$$\text{Inibição (\%)} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. amostra}) / \text{Abs. controle}] \times 100$$

A concentração de uma substância que induz metade do seu efeito máximo (IC_{50}) é a medida que representa a eficácia dos compostos quanto a suas funções biológica ou bioquímica de inibição. Essa medida é inversamente proporcional ao percentual de atividade biológica apresentado pela substância testada contra o DPPH. Esta medida é muito utilizada para nortear e avaliar o potencial antioxidante de substâncias ricas em compostos antioxidantes, por exemplo o mel. Portanto, quanto menor for valor de IC_{50} encontrado na solução de mel, maior será sua capacidade antioxidante. Para calcular o IC_{50} do mel foram formuladas curvas de porcentagem de inibição de DPPH x concentração de mel. A regressão linear do IC_{50} foi calculada de acordo com a curva elaborada.

2.2.2.6 Contagem de bactérias mesófilas totais

Para contagem de bactérias mesófilas totais em amostras de mel foi seguida a metodologia sugerida por Maturin e Peeler (1998) com adaptações. Em placas previamente esterilizadas foram pipetados 1 ml das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) do mel. Em seguida pela técnica de *pour plate* as placas foram preenchidas com ágar a 45 °C. Após o enrijecimento do

ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.2.2.7 Contagem de bactérias ácido lácticas viáveis

A contagem de bactérias lácticas viáveis no mel foi realizada de acordo com a técnica estabelecida por De Man, Rogosa e Sharpe (1960) com modificações. Alíquotas de 1 ml das diluições de mel (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram pipetadas em placas de Petri previamente esterilizadas, posteriormente as placas foram cobertas com uma camada de ágar MRS a 45 °C. Após o endurecimento do meio, uma sobrecamada do ágar MRS foi adicionada às placas, visando a criação de uma atmosfera de 15% de CO₂. Logo após, as placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.3 Análises das características sensoriais do mel ao longo do período de maturação

Também foram avaliadas as características sensoriais do mel ao longo do período de maturação (cor, sabor, aroma, consistência, produção e liberação de gás). Análise de cor foi realizada de acordo com o protocolo da USDA (1985) descrito no item 2.1.1.9.

O sabor foi classificado dentre os possíveis atributos: característico, melado de cana, cera, floral, frutal, queimado, verde, doce, ácido e amargo. Já o aroma foi analisado dentre os atributos: característico, doce, ácido, cera, floral, frutal, caramelizado e refrescante (ALVES; MODESTA; SILVA, 2005).

A consistência do mel foi analisada visualmente e classificada como líquida, líquida-cristalizada, líquida-granulada, cristalizada, granulada e cremosa (COUTO, 2002).

A efervescência do mel (produção e liberação de gás) foi avaliada a olho nu e classificada como ausente/presente através da visualização do desprendimento de bolhas de gás no mel ao longo do processo de maturação (JAYABALAN *et al.*, 2014).

2.4 Análises estatísticas dos dados

Os resultados das características do mel de abelha jandaíra *in natura* foram expostos de maneira descritiva por meio de tabelas e gráficos. Análises das diferenças em função dos tempos de coletas do mel maturado foram realizadas através do teste T pareado. Em todas as

análises o nível de significância adotado para diferenças estatísticas foi $P < 0,001$. No texto, médias são representados como médias aritméticas \pm desvio padrão.

Para avaliar a relação existente entre os parâmetros do mel ao longo do período de maturação foi realizada correlação linear. Correlações significativas foram expressas na forma de gráficos de linha. As características sensoriais do mel ao longo do processo de maturação foram explanadas na forma de tabelas.

3 RESULTADOS

3.1 Características do mel fresco de abelha jandaíra

3.1.1 Características microbiológicas do mel *in natura* de *M. subnitida*

Através dos resultados desta pesquisa foi possível identificar baixa incidência de microrganismos contaminantes em amostras de mel fresco de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte (Tabela 2). As contagens de coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* spp. se mantiveram abaixo do limite de detecção dos métodos de detecção utilizados ($< 1,3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Não houve detecção de *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras de mel analisadas.

Os únicos microrganismos com crescimento detectável nas amostras de mel *in natura* foram os bolores e leveduras com valores de contagem microbiana variando entre 1,9 e 4,85 $\text{Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Porém as amostras M1, M8, M13 e M28 demonstraram contagens de bolores e leveduras abaixo do limite de detecção do método ($< 1,18 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$).

Tabela 2. Características microbiológicas do mel *in natura* de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio grande do Norte, Brasil.

Amostras	Coliformes Totais	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Salmonella</i> spp.	Bolores e leveduras
M1	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18
M2	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	4,1
M3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,5
M4	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2
M5	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	3

M6	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,75
M7	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,65
M8	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,05
M9	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18
M10	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,8
M11	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,2
M12	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,5
M13	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18
M14	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	3,3
M15	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,05
M16	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,25
M17	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,45
M18	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	4,85
M19	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,85
M20	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,05
M21	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,9
M22	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,15
M23	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,2
M24	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	3,05
M25	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	3,25
M26	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,2
M27	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2,4
M28	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18
M29	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	1,9
M30	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	2

Resultados expressos em Log₁₀ UFC/g.

3.1.2 Características físico-químicas do mel in natura de *M. subnitida*

Os parâmetros físico-químicos se mostraram variáveis nas amostras de mel *in natura* de abelha jandaíra (Tabela 3). O teor de umidade encontrado foi em média 26,5 g/100 g com valores variando entre 23,2 e 29,1 g/100 g.

O pH de todas as amostras se manteve numa faixa entre 3,0 e 4,0 com média de 3,5 e valores variando entre 3,16 e 3,97. Porém, diferentemente do pH, a acidez das amostras de mel se mostrou bastante variável com média de 36,14 mEq/kg e valores variando entre 17,7 e 76,4 mEq/kg. A amostra M1 foi a que apresentou o maior valor de acidez encontrado (76,4 mEq/kg), acredita-se que essa amostra já tinha iniciado o seu processo de maturação natural dentro do pote.

O teor de hidroximetilfurfural das amostras avaliadas também se mostrou variável, porém, a maioria delas (86,6 %) apresentaram valores de HMF menores do que 10 mg/kg. O teor médio de HMF encontrado foi de 6,15 mg/kg variando de 0,4 a 41,2 mg/kg.

Todas as amostras avaliadas mostraram-se ricas em açúcares redutores, a média encontrada foi de 67,58 g/100 g com valores variando entre 54,47 e 75,5 g/100 g. Já em relação ao teor de sacarose aparente, foi encontrada uma média de 2,89 g/100 g com valores variando entre 0,36 e 9,41 g/100 g.

O teor de sólidos insolúveis em água se mostrou baixo em todas as amostras analisadas com 73,3 % das amostras avaliadas apresentando teor menor ou igual a 0,1 g/100 g. O teor encontrado variou entre 0,01 e 0,8 g/100 g com média de 0,1 g/100 g. O teor de cinzas encontrado na maioria das amostras (83,3 %) apresentou-se abaixo de 0,6 g/100 g com média de 0,27 g/100 g e valores variando entre 0,01 e 1,48 g/100 g.

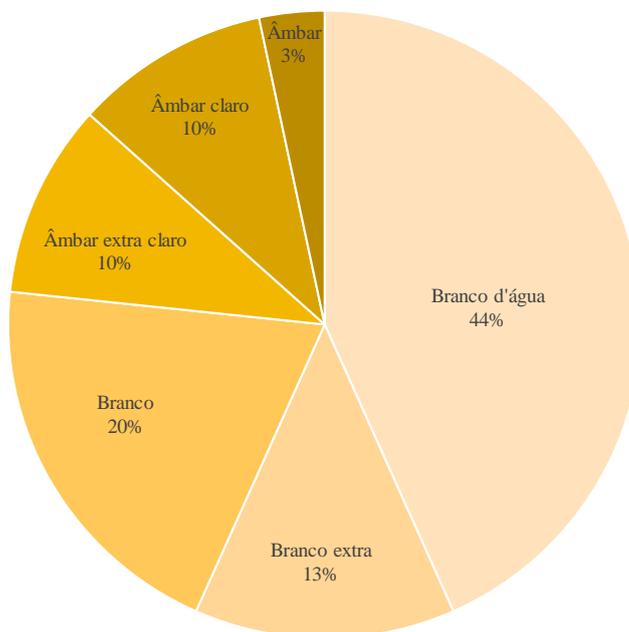
Tabela 3. Características físico-químicas do mel *in natura* de *Melipona subnitida* da região semiárida do estado do Rio grande do Norte, Brasil.

Amostras	Umidade (g/ 100 g)	pH	Acidez Livre (mEq/kg)	HMF (mg/kg)	Açúcares redutores (g/ 100g)	Sacarose aparente (g/100 g)	Sólidos insolúveis (g/ 100 g)	Cinzas (g/100 g)
M1	26,65	3,3	76,42	1,12	72,99	1,02	0,1	0,07
M2	27,6	3,3	47,72	8,98	64,66	9,41	0,11	0,08
M3	26,65	3,32	39,44	1,79	66,67	3,29	0,18	0,04
M4	23,65	3,38	54,5	41,02	64,94	1,02	0,1	0,01
M5	26,3	3,3	26,66	0,89	69,2	0,93	0,09	0,08
M6	25,7	3,57	20,21	2,99	54,47	0,75	0,07	0,03
M7	26,3	3,3	23,6	0,89	69,2	0,92	0,06	0,08
M8	27	3,7	24,15	1,94	64,51	4,7	0,11	0,2
M9	28,6	3,28	34,26	9,13	61,91	5,05	0,05	0,22

M10	27,2	3,3	49,3	23,95	66,55	4,87	0,02	0,75
M11	24,3	3,6	39,44	4,49	72,46	1,61	0,15	0,04
M12	25,8	3,38	47,45	1,64	70,92	2,99	0,1	0,04
M13	26,65	3,31	46,1	1,34	64,93	0,81	0,03	0,05
M14	23,5	3,48	29,09	39,37	74,07	5,94	0,02	0,03
M15	26,4	3,34	48,07	2,99	64,3	6,28	0,05	0,03
M16	26,7	3,16	56,2	4,04	69,68	0,56	0,05	0,1
M17	26,5	3,38	47,08	2,39	67,34	6,39	0,11	0,02
M18	26,3	3,5	33,28	1,49	68,96	5,11	0,8	0,03
M19	27,1	3,74	17,74	2,99	60,24	0,36	0,186	0,05
M20	27,3	3,46	27,67	5,53	65,57	0,83	0,03	0,99
M21	27,2	3,57	22,44	1,04	62,89	6,22	0,03	0,89
M22	29,1	3,31	29,67	0,14	60,9	2,79	0,05	1,48
M23	26,5	3,62	37,41	1,49	70,17	0,71	0,01	1,19
M24	25,6	3,75	29,8	0,59	62,89	0,92	0,04	0,06
M25	27,2	3,46	34,77	2,6	69,44	1,16	0,03	0,14
M26	28,45	3,7	42,23	3,44	68,49	3,03	0,12	0,06
M27	24	3,9	26,31	13,62	73,8	4,18	0,1	0,25
M28	23,5	3,76	32,53	0,59	74,9	3,05	0,08	0,43
M29	23,2	3,92	21,56	0,15	75,5	1,35	0,1	0,17
M30	23,5	3,97	19,13	1,94	74,7	0,59	0,09	0,41

A partir dos dados obtidos foi possível identificar que o padrão de coloração do mel da abelha jandaíra da região semiárida apresenta-se em tons claros em sua maioria (Figura 4). A coloração mais encontrada nas amostras foi branco d'água (0 a 8 mm Pfund), cerca de 44% das amostras apresentam essa coloração. Em segundo lugar, o tom Branco (17 a 34 mm Pfund) foi encontrado em 20% das amostras analisadas.

Figura 4. Percentual de distribuição da cor do mel *in natura* de *Melipona subnitida* provenientes da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte (n = 30).



Fonte: Kewen Santiago.

3.2 Caracterização do processo de maturação do mel da abelha Jandaíra

3.2.1 Características microbiológicas do mel de *M. subnitida* ao longo do processo de maturação

Através dos resultados deste estudo foi possível identificar diferentes microrganismos no mel de *Melipona subnitida* durante o processo de maturação. Também foi possível identificar que a partir do primeiro mês de maturação, as contagens microbianas atingem níveis muito baixos e não capazes de serem detectados pelo método utilizado (Tabela 4).

Em nenhum momento do período de maturação foi possível identificar a presença de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* spp. na amostra. Por outro lado, foi possível identificar presença de bactérias mesófilas totais (4,1 log₁₀ UFC/g), bactérias ácido lácticas (4,3 log₁₀ UFC/g) e bolores e leveduras (3,6 log₁₀ UFC/g) no tempo inicial.

Tabela 4. Características microbiológicas do mel de *Melipona subnitida* ao longo do período de maturação.

Microrganismos	Tempo				
	T0	T30	T60	T90	T120
Bactérias mesófilas totais	4,1 ± 0,2	< 1,5	< 1,5	< 1,5	< 1,5
Coliformes totais	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
<i>E. coli</i>	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
<i>S. aureus</i>	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3
Bactérias ácido lácticas	4,3 ± 0,1	< 1,5	< 1,5	< 1,5	< 1,5
Bolores e leveduras	3,6 ± 0,4	< 1,2	< 1,2	< 1,2	< 1,2
<i>Salmonella</i>	Ausente				

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n = 5). Resultados expressos em Log₁₀ UFC/g.

3.3.2 Características físico-químicas do mel de *M. subnitida* ao longo do processo de maturação

A maioria das características físico-químicas analisadas sofreram alterações consideráveis durante o processo de maturação do mel (Tabela 5). A umidade foi uma das únicas características que não apresentou diferenças significativas e se manteve constante durante todo o período de maturação ($p < 0,001$). Em contrapartida, foi detectado o decréscimo do valor de pH e aumento considerável da acidez ao longo da maturação ($p < 0,001$).

Tabela 5. Características físico-químicas do mel de *Melipona subnitida* ao longo do período de maturação.

Parâmetros	Tempo				
	T0	T30	T60	T90	T120
Umidade _(g/100g)	27,0 ± 0,7 ^A	26,68 ± 0,5 ^A	26,5 ± 0,5 ^A	26,7 ± 0,1 ^A	26,8 ± 0,2 ^A
pH	4,0 ± 0,1 ^A	3,50 ± 0,01 ^B	3,4 ± 0,01 ^C	3,36 ± 0,05 ^C	3,4 ± 0,05 ^C
Acidez livre (mEq/kg)	32,0 ± 1,6 ^A	95,55 ± 0,8 ^B	93,8 ± 0,2 ^B	106,44 ± 3,86 ^C	105,0 ± 2,80 ^C
Açúcares reduzidos (g/100g)	73,3 ± 0,7 ^A	67,15 ± 0,3 ^B	66,4 ± 0,2 ^C	66,3 ± 0,37 ^C	66,7 ± 0,22 ^C
Sacarose aparente (g/100g)	0,7 ± 0,12 ^A	0,39 ± 0,02 ^A	0,38 ± 0,05 ^A	0,37 ± 0,06 ^A	0,4 ± 0,02 ^A
HMF (mg/kg)	1,4 ± 0,1 ^A	0,69 ± 0,4 ^A	3,5 ± 0,8 ^B	1,35 ± 0,1 ^A	1,2 ± 0,3 ^A

Cinzas (g/100g)	0,1 ± 0,03 ^A	0,18 ± 0,04 ^B	0,16 ± 0,01 ^B	0,13 ± 0,01 ^{AB}	0,18 ± 0,02 ^C
Sólidos Insolúveis (g/100g)	0,1 ± 0,1 ^A	0,2 ± 0,1 ^{AB}	0,04 ± 0,01 ^A	0,11 ± 0,02 ^A	0,01 ± 0,002 ^C
°Brix	75,9 ± 0,2 ^A	71,0 ± 0,1 ^B	71,7 ± 0,7 ^{BC}	71,8 ± 0,4 ^C	71,4 ± 0,2 ^{BC}
Densidade (g/mL)	1,33 ± 0,008 ^A	1,34 ± 0,008 ^B	1,36 ± 0,001 ^C	1,36 ± 0,004 ^C	1,36 ± 0,004 ^C
CFT (mg EAG/g)	0,37 ± 0,003 ^A	0,35 ± 0,001 ^A	0,29 ± 0,014 ^B	0,46 ± 0,003 ^C	0,44 ± 0,027 ^D
FLV (mg EQ/g)	0,014 ± 0,003 ^A	0,012 ± 0,002 ^A	0,015 ± 0,001 ^A	0,013 ± 0,001 ^A	0,013 ± 0,001 ^A
AA (% de inibição)	40,89 ± 4,872 ^A	48,73 ± 0,774 ^B	45,73 ± 0,633 ^B	70,59 ± 0,356 ^C	71,10 ± 0,511 ^C
CE50 (µg/ml)	0,86 ± 0,11 ^A	0,93 ± 0,03 ^A	1,25 ± 0,063 ^B	0,024 ± 0,004 ^C	0,042 ± 0,013 ^C

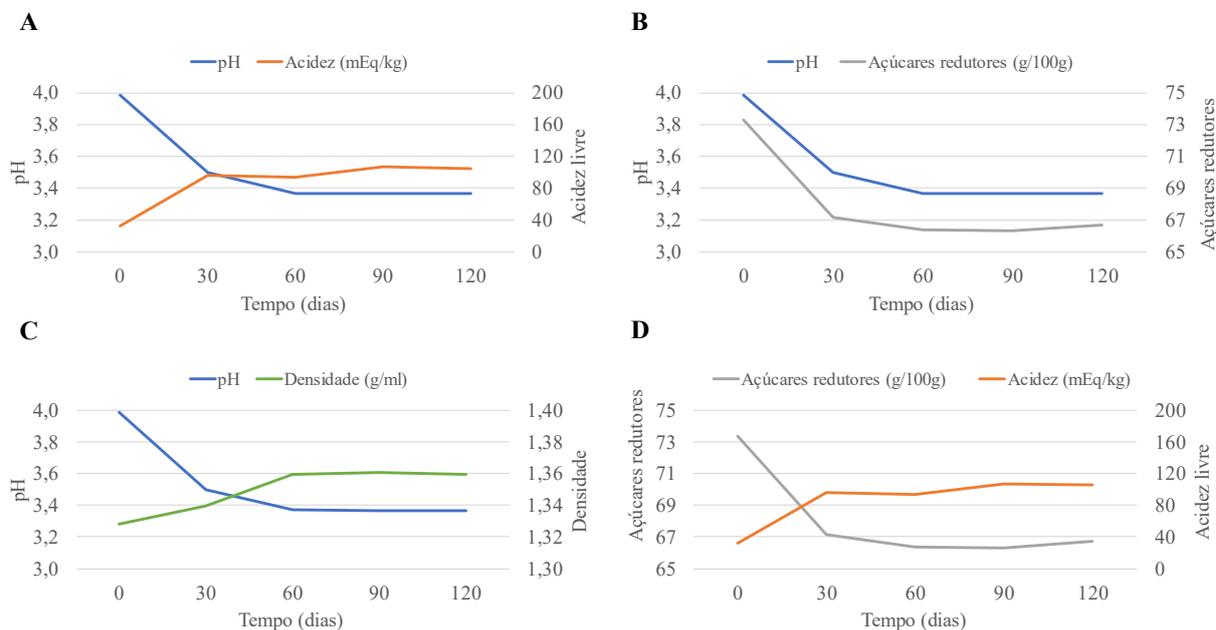
Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n = 5). Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística significativa, de acordo com o teste T pareado (p<0,001). HMF: Hidroximetilfurfural; CFT: Compostos fenólicos totais; FLV: Flavonoides; EAG: equivalente de ácido gálico; EQ: equivalente de quercetina; CE₅₀: concentração efetiva.

O teor de açúcares totais (° Brix) e de açúcares redutores também se mostraram decrescente nos primeiros 30 dias de fermentação, mantendo-se estáveis após 60 dias de maturação. A sacarose aparente demonstrou padrão diferente e se manteve estável durante todo o período de maturação (p<0,001). Também foi observado um aumento significativo da densidade do mel nos primeiros 60 dias de fermentação, estabilizando-se após esse período (p<0,001).

Quanto aos compostos bioativos presentes no mel, observou-se aumento significativo do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante após 90 dias d processo de maturação (p<0,001). Porém, diferentemente do teor de compostos fenólicos totais, a quantidade de flavonoides presente no mel manteve-se constante (p<0,001).

A partir de correlação linear foi possível encontrar interações existentes entre os parâmetros físico-químicos do mel ao longo do tempo. Observou-se que o pH do mel é uma importante medida para acompanhar as alterações que nele ocorrem (Figura 5). Durante o período de maturação o pH se tornou mais ácido gradativamente. Enquanto isso o teor de acidez subia (r = -0,945; p<0,001), o teor de açúcares redutores caia (r = 0,962; p<0,001) e o mel se tornava mais denso (r = -0,861; p<0,001).

Figura 5. Interação entre parâmetros físico-químicos de *M. subnitida* ao longo de 120 dias do processo de maturação.



A: pH e acidez livre, B: pH e açúcares redutores, C: pH e densidade, D: açúcares redutores e acidez livre.

Fonte: Kewen Santiago

Outros parâmetros que se correlacionaram de maneira forte foram o teor de açúcares redutores e a acidez livre do mel durante o período de maturação (Figura 5D). Enquanto o teor de açúcares caiu de forma gradativa até se tornar estável no segundo mês de maturação, a acidez continuou subindo gradativamente até atingir a estabilidade depois de 90 dias da maturação do mel ($r = -0,970$; $p < 0,001$).

De maneira geral, os fatores do mel de abelha jandaíra se relacionam durante todo o período de maturação e são reflexos das modificações bioquímicas que ocorrem ao longo do processo. A forte correlação entre a queda do pH, aumento da acidez livre, diminuição dos açúcares redutores e aumento da densidade do mel são um forte indicativo que parte dos processos de maturação que ocorrem no mel provém da sua microbiota intrínseca que metaboliza açúcares simples e os transforma em compostos ácidos voláteis que diminuem o pH do mel, aumentam sua acidez e densidade.

3.2.3 Características sensoriais do mel de *M. subnitida* ao longo do processo de maturação

Os resultados obtidos através da análise das características sensoriais do mel ao longo do processo de maturação demonstraram as diferentes variações sensoriais que o produto passa durante o processo (Tabela 6). Antes da maturação, o mel apresenta-se como um alimento

totalmente diferente do produto obtido após o final do processo. No início da maturação o mel de jandaíra apresentou sabor doce suave, aroma adocicado e de consistência líquida sem liberação de gás (formação de bolhas de efervescência).

Tabela 6. Características sensoriais do mel de *Melipona subnitida* ao longo do período de maturação.

Parâmetro	Tempo				
	Tempo inicial	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias
Cor (mm Pfund)	19 (Branco)	21 (Branco)	24 (Branco)	24 (Branco)	28 (Branco)
Sabor	Doce suave	Fermentado forte	Fermentado	Fermentado e ácido	Ácido suave
Aroma	Adocicado	Fermentado	Fermentado	Ácido	Agridoce
Consistência	Líquida	Líquida	Líquida	Líquida	Líquida
Liberação de Gás	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente

Após 30 dias do início do processo, o mel se apresentou com aspecto totalmente diferente do período inicial, um forte aroma e sabor de produto fermentado podia ser observado. A consistência líquida permaneceu inalterada, porém verificou-se forte desprendimento de bolhas de gás do produto. Ao chegar no segundo mês do processo de maturação o mel encontrava-se similar ao encontrado na análise anterior.

Após 90 dias já era possível observar modificações das características organolépticas do produto. O aroma fermentado permanecia, mas também se observou cheiro ácido proveniente do mel. O sabor ácido destacou-se, a consistência líquida permanecia inalterada e desprendimento de gás não foi mais observado.

Após 120 dias do processo de maturação, o mel apresentou características organolépticas diferenciadas de todos os tempos experimentais anteriores, o aroma ácido permaneceu, porém bem mais suave. Foi possível identificar sabor agridoce no produto. Não se observou desprendimento de gás e a consistência líquida permanecia inalterada.

Ao longo de 120 dias de maturação a cor do mel permaneceu inalterada a olho nu, mas nos resultados de fotolorimetria foi possível observar o aumento nos valores da escala *Pfund*, e por consequência do escurecimento do produto.

4 DISCUSSÃO

O Brasil é um país extremamente biodiverso em número de espécies de abelhas sem ferrão. Porém, muitas dessas espécies produzem mel suficiente apenas para nutrir a colmeia. Somente algumas espécies são excelentes produtoras de mel, como o gênero *Melipona*, com espécies de grande potencial meliponícola e amplamente criadas no país. (ALVES, 2013; MICHENER, 2013; JAFFÉ *et al.*, 2015).

Porém, a maior parte da produção de mel de abelhas sem ferrão no Brasil, principalmente na região nordeste ainda é artesanal e em baixa escala. A falta de legislação que atenda a singularidade das espécies meliponícolas de cada região brasileira é um entrave para a produção e comercialização desse mel (JAFFÉ *et al.*, 2015).

As peculiaridades físico-químicos de cada mel são uma das razões que dificultam a comercialização do mel das abelhas sem ferrão. Neste estudo foi possível observar que o mel da abelha jandaíra, assim como o mel de outras espécies de abelhas nativas apresenta alto teor de umidade que favorece a proliferação de microrganismos. Esta água relativamente abundante no mel permite que alguns microrganismos sobrevivam e se desenvolvam ativamente (ALVES *et al.*, 2018).

O teor de umidade do mel é um ponto chave para sua vida útil. Em geral, o alto teor de umidade favorece que ocorra o processo de fermentação descontrolada do mel, o que pode ocasionar deterioração e perda de sabor, levando à queda de qualidade do produto (PÉREZ-ARQUILLUÉ *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 1999).

A diferença estatística significativa entre parâmetros físico-químicos chave como acidez e teor de açúcares redutores além da discrepância do valor de contagens microbianas encontradas no tempo inicial e 30 dias são um indicativo de que o mel de abelha jandaíra se mantém fresco por curto período e que métodos de conservação devem ser empregados imediatamente após a colheita.

É crescente o emprego de tecnologias que buscam preservar o mel das abelhas sem ferrão com o intuito de garantir sua qualidade como produto de alto valor agregado (VILLAS-BÔAS, 2018; SOUZA; MENEZES; FLACH, 2021).

Uma das técnicas que vem ganhando destaque na atualidade é conhecida como maturação. O processo de maturação do mel de abelhas sem ferrão está ligado ao conceito de que nem todo mel fermentado é mel estragado (CAMARGO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2018).

A maturação é um processo que ocorre naturalmente no interior dos potes de mel da colmeia. Os indícios mais comuns da fermentação do mel dentro da colmeia é a presença de espuma e desprendimento de bolhas de gás dentro dos potes, provavelmente provenientes de processos fermentativos ou químicos (MENEZES *et al.*, 2013).

De acordo com Ribeiro *et al.* (2018) quando o mel é extraído através de práticas higiênicas e submetido a um período de maturação que dura em média de quatro a seis meses tem sua vida de prateleira aumentada em até dois anos.

Os dados deste estudo revelaram que após 30 dias do processo de maturação do mel, grande parte da flora microbiana é inativada indicando que o processo de maturação é uma técnica formidável em garantir a segurança sanitária do mel como alimento.

A fermentação é um processo bioquímico que transforma os carboidratos em outras substâncias orgânicas, fornecendo energia aos microrganismos. Existem três categorias principais de fermentação: alcoólica, na qual os carboidratos são transformados em álcool; acética, quando o álcool é transformado em ácido acético; e láctico, no qual os carboidratos são transformados em ácido láctico e outros subprodutos orgânicos. Fermentações mistas também ocorrem na natureza (MENEZES *et al.*, 2013).

Características como o aumento considerável da acidez livre, a diminuição dos açúcares redutores e desprendimento de bolhas de gás observadas no mel de *M. subnitida* ao longo do processo de maturação são um indicativo de que diferentes grupos de microrganismos desempenham atividades fermentativas no mel, podendo-se caracterizar como um processo de fermentação misto.

A presença de alta carga de bactérias ácido lácticas e de bolores de leveduras no tempo inicial do processo são um indicativo de que esses microrganismos são os principais responsáveis pela maturação do mel de jandaíra.

Leveduras osmofílicas do gênero *Starmerella* são microrganismos frequentemente encontrados em associação com as abelhas sem ferrão. As leveduras do gênero *Starmerella* podem participar de processos fermentativos de conversão de açúcares redutores em álcoois e ácidos orgânicos. Devido ao padrão fermentativo observado ao longo do processo de maturação, esse gênero de leveduras pode estar diretamente relacionado à maturação do mel de abelha jandaíra (SANTOS *et al.*, 2018; LEMOS-JÚNIOR *et al.*, 2019; COSTA-NETO; MORAIS, 2020).

Outro grupo de microrganismos que pode estar associados ao processo de maturação do mel da abelha jandaíra são as bactérias ácido lácticas. As bactérias ácido lácticas são microrganismos frequentemente encontrados no trato gastrointestinal das abelhas sem ferrão e

nas flores que essas abelhas visitam (MORAIS; CALAÇA; ROSA, 2013; YAACOB *et al.*, 2018).

A proliferação desses microrganismos possivelmente resulta na produção e liberação de ácidos orgânicos no mel dos meliponíneos. Os ácidos orgânicos são compostos bioativos de extrema importância nutricional e antimicrobiana. Os ácidos orgânicos atuam diminuindo o pH do mel, dessa forma inibem a ação da flora deteriorante e patogênica do alimento (GILLIAM; ROUBIK; LORENZ, 1990; SZUTOWSKA, 2020).

Outra característica dos ácidos orgânicos é seu potencial antimicrobiano. Os ácidos orgânicos podem penetrar na parede celular das bactérias. Após a difusão passiva de ácidos orgânicos na bactéria, os ácidos se dissociam e se acumulam no citoplasma microbiano. Como consequência, pH interno da bactéria é reduzido e a pressão osmótica aumentada. Devido a isso, muitas funções metabólicas são interrompidas e o crescimento microbiano é interrompido (PEARLIN *et al.*, 2020).

Outro benefício do processo de maturação é o incremento das características sensoriais do produto. Ao longo do processo de maturação, o mel da jandaíra passou de um alimento de sabor e aroma adocicado para características organolépticas mais rebuscadas como sabor agridoce e aroma levemente ácido, características refinadas e muito apreciadas pelo consumidor (FERNANDES; ROSA; CONTI-SILVA, 2020).

A importância deste estudo está no seu pioneirismo em detalhar as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do mel de *M. subnitida*. Segundo Villas-Bôas (2018) são poucos os estudos que descreveram detalhadamente o comportamento físico-químico, microbiológico e sensorial do mel de abelhas sem ferrão durante o processo de maturação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo foi demonstrado que o processo de maturação do mel da abelha jandaíra contribui positivamente para a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial do produto.

O mel maturado de abelha jandaíra mostrou-se como um alimento sem atividade nenhuma antimicrobiana detectável. O processo de maturação não influenciou no aumento do teor de hidroximetilfurfural do mel. Desta forma, o mel de maturado de abelha jandaíra apresentou-se como um alimento seguro ao consumo humano, sem presença de microrganismos patogênicos nem de compostos tóxicos.

REFERÊNCIAS

- AIRES-NETO, T.; CARVALHO, F. C. **A meliponicultura tradicional no Rio Grande do Norte e arredores.** In: FONSECA, V. L. I.; KOEDAM, D.; HRNCIR, M. A abelha Jandaíra: no passado, presente e no futuro. Mossoró: EduFERSA. p. 109-114, 2017.
- ALVES, M. A.; MODESTA, R. C. D; SILVA, A. L. S. **Desenvolvimento do Perfil Sensorial de Méis Silvestres (*Apis Mellifera*) de Vários Municípios do Estado de Alagoas.** Rio de Janeiro, RJ: EMBRAPA/Agroindústria de Alimentos. (EMBRAPA/Agroindústria de Alimentos. Comunicado Técnico, 86), 6p., 2005.
- ALVES, R. M. O.; VIANA, J. L.; SOUSA, H. A. C.; WALDSCHMIDT, A. M. Physico-chemical Parameters of Honey From *Melipona mondury* Smith, 1863 (Hymenoptera: apidae). **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 7, p. 196, 2018.
- ALVES, T. T. L.; MENESES, A. R. V.; SILVA, J. N.; PARENTE, G. D. L.; NETO, J. P. H. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 91-97, 2011.
- CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 20, e2016157, 2017.
- CARVALHO, A. T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro.** Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 41-72, 2017.
- COSTA, L.; ALBUQUERQUE, M.; TRUGO, L.; QUINTEIRO, L.; BARTH, O.; RIBEIRO, M.; MARIA, C. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin Brazilian honeys. **Food Chemistry**, v. 65, p. 347-352, 1999.
- COSTA-NETO, D. J.; MORAIS, P. B. The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a Neotropical savanna. **Fungal Ecology**, v. 47, p. 100973, 2020.
- COUTO, R. H. N., Apicultura: manejo e produtos, Jaboticabal, FUNEP, 2 ed., 191p, 2002.
- CRANE, E. The World History of Beekeeping and Honey Hunting. Duckworth; London, UK, 682 pp., 1999.
- DANTAS, M. C. A. M.; BATISTA, J. L.; DANTAS, P. A. M.; DANTAS, I. M.; DIAS, V. H. P.; ANDRADE FILHO, F. C.; MOREIRA, J. N.; MIELEZRSKI, G. L. N.; SILVA, M. G.; MAIA, A. G.; MEDEIROS, A. C.; MARACAJÁ, P. B. Stingless bee and its socioeconomic potential in the States of Paraíba and Rio Grande do Norte. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3309107939, 2020.
- Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p.571-577, 2005.

DIAS, M. P. S.; CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTELI, M. N.; BERTO, M. I. **Levantamento de tecnologias de conservação de mel de abelhas nativas em função de suas propriedades físico-químicas.** Anais do CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIIC, v. 8, 2014.

DRUMMOND, M. S. **Maturação do mel de abelhas nativas sem ferrão: novo panorama de consumo no mercado gastronômico.** Em Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Apicultura, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, 1-3 f., 2011.

FERNANDES, R. T.; ROSA, I. G.; CONTI-SILVA, A. C. Honey from Tiúba stingless bees (*Melipona fasciculata*) produced in different ecosystems: physical and sensory studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 9, p. 3748–3754, 2020.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, Paris, v. 21, n. 2, p.89-97, 1990.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos.** 4ª ed. (1ª Edição digital), 1020 p., 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul., 2007.

JAYABALAN, R.; MALBAŠA, R. V.; LONČAR, E. S.; VITAS, J. S.; SATHISHKUMAR, M. A Review on Kombucha Tea — Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538–550, 2014.

KOFFLER, S. M.; MENEZES, C.; KLEINERT, P. R.; PEIXOTO, A. M.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; POPE, N.; JAFFÉ, R. Temporal Variation in Honey Production by the Stingless Bee *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): Long-Term Management Reveals its Potential as a Commercial Species in Northeastern Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 3, p. 858–867, 2015.

LEMOS-JUNIOR, W. J. F.; NADAI, C.; CREPALDE, L. T.; OLIVEIRA, V. S.; MATOS, A. D.; GIACOMINI, A.; CORICH, V. Potential use of *Starmerella bacillaris* as fermentation starter for the production of low-alcohol beverages obtained from unripe grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 303, p. 1-8, 2019.

MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.

MANAFI, M; KNEIFEL, W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water. **International journal of hygiene and environmental medicine**, v. 189, n. 3, p. 225–234, 1989.

MATURIN, L.; PEELER, J. T. **Aerobic Plate Count.** In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F. A. F. L.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping.** In: VIT, P.; PEDRO, S. R.; ROUBIK, D., editors. Pot-Honey. Springer; New York, NY, USA, pp. 173–186, 2013.

MORAIS, P. B.; CALAÇA, P. S. S. T.; ROSA, C. A. **Microorganisms Associated with Stingless Bees.** In: VIT, P.; PEDRO, S. R.; ROUBIK, D., editors. Pot-Honey. Springer; New York, NY, USA, pp. 153–172, 2013.

MORTON, R. D. **Aerobic Plate Count.** In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington DC. American Public Health Association. 4. ed., p.63-67, 2001.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** São Paulo: Editora Noguesirapis, 446p., 1997.

PEARLIN, B. V.; MUTHUVEL, S.; GOVIDASAMY, P.; VILLAVAN, M.; ALAGAWANY, M.; FARAG, M. R.; DHAMA, K.; GOPI, M. Role of acidifiers in livestock nutrition and health: A review. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 104, n. 2, p. 558–569, 2020.

PÉREZ-ARQUILLUÉ, C.; CONCHELLO, P.; ARIÑO, A.; JUAN, T.; HERRERA, A. Quality evaluation of Spanish rosemary (*Rosmarinus officinalis*) honey. **Food Chemistry**, v. 51, p. 207-210, 1994.

RIBEIRO, G. P.; VILLAS-BÔAS, J. K.; SPINOSA, W. A.; PRUDENCIO, S. H. Influence of freezing, pasteurization, and maturation on Tiúba honey quality. **LWT**, v. 90, p. 607–612, 2018.

SANTOS, A. R. O.; LEON, M. P.; BARROS, K. O.; FREITAS, L. F. D.; HUGHES, A. F. S.; MORAIS, P. B.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis* f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1333–1343, 2018.

SILVA, J. B. A.; PINHEIRO, C. G. M. E. O mel de jandaíra: caracterização físico-química. **A abelha jandaíra: no passado, no presente e no futuro.** Editora Universitária da UFERSA, Mossoró, Brasil, p. 157-160, 2017.

SOUZA, E. C. A.; MENEZES, C.; FLACH, A. Stingless bee honey (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): a review of quality control, chemical profile, and biological potential. **Apidologie**, v. 52, n. 1, p. 113–132, 2021.

SZUTOWSKA, J. Functional properties of lactic acid bacteria in fermented fruit and vegetable juices: a systematic literature review. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 3, p. 357-372, 2020.

TALLENT, S.; HAIT, J.; BENNETT, R. W.; LANCETTE G. A. *Staphylococcus aureus*. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

TOURNAS, V.; STACK, M. E.; MISLIVEC, P. B.; KOCH, H. A.; BANDLER, R. **Yeasts, molds and mycotoxins**. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

USDA. “*United States Standards for Grades of Extracted Honey*”, fifth ed., In: Agricultural Marketing Service Fruit and Vegetable Division Processed Products Branch. Washington, DC: US Department of Agriculture, 1985.

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

VILLAS-BÔAS, J. K. **Manual de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas sem Ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2. ed., 212 p., 2018.

YAACOB, S. N. S.; HUYOP, F.; IBRAHIM, R. K. R.; WAHAB, R. A. Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from fresh *Heterotrigona itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, n. 3, p. 395-405, 2018.

ZANELLA, F. C. V.; MARTINS, C. F. **Abelhas da caatinga: biogeografia, ecologia e conservação**. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Ecologia e Conservação da caatinga, Editora Universitária da UFPE, Recife, Brasil, p. 75-134, 2003.

CAPÍTULO V
O SABURÁ DA ABELHA JANDAÍRA

RESUMO

O pólen é uma excelente fonte nutricional para alimentação humana. Devido às suas propriedades nutricionais e por ser considerado um produto natural o pólen de abelha é atualmente consumido comercialmente como suplemento alimentar. As abelhas sem ferrão coletam o pólen das plantas e o armazenam em potes de cera dentro da colmeia. Este pólen passa por diversas modificações microbiológicas e bioquímicas e ao final do processo recebe o nome de saburá. No Brasil vem crescendo a comercialização do saburá das abelhas sem ferrão devido ao seu alto valor nutricional, propriedades nutricionais e medicinais e seu sabor único. O saburá da abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) apresenta grande potencial nutricional devido a presença de aminoácidos essenciais, de minerais, de flavonoides e de açúcar D-manitol em sua composição. Apesar de ser um produto com grande potencial de mercado no Brasil. A produção e comercialização do saburá de abelha jandaíra ainda sofre vários entraves. As características físico-químicas e microbiológicas do produto ainda permanecem desconhecidas, pois poucos estudos foram realizados para caracterizá-lo. Diante desta problemática este estudo objetivou caracterizar o saburá de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte. Para realização do experimento, foram coletadas seis amostras de saburá de abelha jandaíra em meliponários de zona rural e urbana do município de Mossoró, Brasil. Foram realizadas análises microbiológicas de bactérias mesófilas totais, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp., bolores e leveduras e bactérias ácido lácticas. Além disso, as amostras foram submetidas a análises físico-químicas de matéria seca, matéria mineral (cinzas), proteína bruta, extrato etéreo, açúcares totais e fibras em detergente neutro (fibras) através de espectroscopia de infravermelho próximo, também foram realizadas análises de pH e acidez das amostras. Através dos resultados obtidos foi possível constatar que não houve detecção de microrganismos nas amostras de saburá analisadas, indicativo de que os processos bioquímicos e microbianos gerenciados pelas abelhas são eficientes em inibir a deterioração deste produto. Quanto aos parâmetros físico-químicos as amostras de saburá apresentaram teores médios de umidade de 27,2 g/100 g; proteína bruta 31,1 g/100 g; açúcares totais 55,2 g/100 g; pH 3,5 e acidez 1023,7 mEq/kg. O saburá da abelha jandaíra mostrou-se como um alimento rico em proteínas e carboidratos e seguro para o consumo humano devido ao baixo teor de microrganismos nele encontrado. Porém, para que sua produção e comercialização seja impulsionada é necessário que haja a regulamentação e adequação dos parâmetros legais a esse produto para que ele seja fiscalizado adequadamente.

Palavras-chave: Meliponini, Fermentação, Pólen, Legislação

ABSTRACT

Pollen has gained prominence as an excellent nutritional source for human consumption due to its nutritional properties. Bee pollen is currently consumed commercially as a food supplement. Stingless bees collect pollen from plants and store it in wax pots inside the hive. The pollen goes through microbiological and biochemical modifications and at the end of the process it receives the name of “saborá”. In Brazil, the marketing of the saborá has been growing due to its high nutritional value, nutritional and medicinal properties and its unique flavor. The saborá of the bee *Melipona subnitida* has great nutritional potential due to the presence of essential amino acids, minerals, flavonoids and sugar D-mannitol in its composition. This product has a great market potential in Brazil. The production and commercialization of *M. subnitida* saborá face several obstacles. The physical-chemical and microbiological characteristics of the product are still unknown. This study aimed to characterize and establish the physical-chemical and microbiological parameters of the *Melipona subnitida* saborá from the semiarid region. To carry out the experiment, six samples of saborá were collected from rural and urban meliponaries in Mossoró, Brazil. Microbiological analyzes of total mesophilic bacteria, total coliforms and *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp., molds and yeasts and lactic acid bacteria were performed. Physical-chemical analyzes of dry matter, ash, crude protein, ether extract, total sugars, and fibers were carried out using near-infrared spectroscopy, pH and acidity of samples were also evaluated. About the results obtained in this research it was possible to verify that there was no detection of microorganisms in the saborá, indicating that the biochemical and microbial processes managed by bees are efficient to avoid the deterioration of this product. About the physical-chemical parameters, the samples of saborá showed moisture content of 27.2 g/100 g; crude protein 31.1 g/100 g; total sugars 55.2 g/100 g; pH 3.5 and acidity 1023.7 mEq/kg. The saborá *M. subnitida* bee proved to be a proteins and carbohydrates source and it is safe to human consumption due to the low content of microorganisms found in it. However, for its production and commercialization it is necessary the product parameters regulation so that it would be properly inspected.

Keywords: Meliponini, Fermentation, Pollen, Legislation

1 INTRODUÇÃO

O pólen é o gametófito masculino das flores, utilizado como meio para a reprodução das plantas. Diferentes insetos, incluindo as abelhas, aproveitam o pólen como fonte de proteína, vitaminas e minerais (DOMÍNGUEZ; BERMUDEZJ; QUICAZÁN, 2014).

As abelhas sociais coletam o pólen das plantas e o armazenam no interior da colmeia garantindo estoque de alimento para toda a colônia. Assim como para as abelhas, o pólen tem ganhado destaque como uma excelente fonte nutricional para alimentação humana. Devido às suas propriedades nutricionais e por ser considerado um produto natural o pólen de abelha é atualmente consumido comercialmente como suplemento alimentar (KIELISZEK *et al.*, 2018; THAKUR; NANDA, 2020).

De acordo com Ribeiro e Oliveira (2020) o segmento de mercado mundial de pólen de abelha deve se expandir a uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 6%, atingindo a marca de US \$ 720 milhões em 2024.

As abelhas do gênero *Apis* são as espécies mais criadas em todo planeta para a produção e comercialização de pólen apícola. São instaladas armadilhas nas colmeias dessas espécies para coletar o excesso de pólen apícola. Após coletado, o pólen é submetido a processos básicos de beneficiamento, como secagem e remoção de impurezas e em seguida já estão aptos à comercialização. (DOMÍNGUEZ; BERMUDEZJ; QUICAZÁN, 2014; MELO *et al.*, 2016).

Outras espécies de abelhas sociais, dentre elas as abelhas sem ferrão também estocam pólen que pode ser consumido e comercializado. As abelhas sem ferrão coletam o pólen das plantas e o armazenam em potes de cera dentro da colmeia. Este pólen passa por diversas modificações microbiológicas e bioquímicas conduzidas pelas abelhas e ao final do processo recebe o nome de saburá (VIT *et al.*, 2016; ALVES; SODRÉ; CARVALHO, 2018).

No Brasil vem crescendo a comercialização do saburá das abelhas sem ferrão devido ao seu alto valor nutricional, propriedades nutricionais e medicinais e seu sabor único. No mercado da meliponicultura brasileira atual, o pólen de abelhas sem ferrão é comercializado de duas formas: adicionado ao mel, compondo uma mistura agridoce, ou puro *in natura* (ALVES; CARVALHO, 2018; VILLAS-BÔAS, 2018).

Na região semiárida do Brasil, uma espécie de abelha sem ferrão está ganhando destaque devido a qualidade do seu saburá e outros produtos. A abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) é frequentemente criada e utilizada na meliponicultura da região (DANTAS *et al.*, 2020).

O saburá da abelha jandaíra apresenta grande potencial nutritivo. O alto teor de aminoácidos essenciais, de minerais, de flavonoides e de açúcar D-manitol agregam características funcionais a esse alimento (SILVA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013).

Apesar de ser um produto com grande potencial de mercado no Brasil. A produção e comercialização do saburá de abelha jandaíra ainda sofre vários entraves. As características físico-químicas e microbiológicas do produto ainda permanecem desconhecidas, pois poucos estudos foram realizados para caracterizá-lo. A falta de conhecimento na área é um impedimento para o desenvolvimento de técnicas de padronização que impulsionem a regulamentação, produção e comercialização do produto em larga escala (ALVES; CARVALHO, 2018; ALVES; SODRÉ; CARVALHO, 2018).

Diante desta problemática este estudo objetivou caracterizar o saburá de abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte quanto aos seus parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material

Entre os meses de agosto e dezembro de 2020 foram coletadas 6 amostras de saburá de abelha jandaíra provenientes de meliponários instalados em zonas urbana e rural do município de Mossoró, Brasil (Figura 1). As amostras foram coletadas seguindo as boas práticas de higiene, foram acondicionadas em coletores universais estéreis e foram levadas para o no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) para realização das análises.

Figura 1. Potes de saburá de *Melipona subnitida* em meliponário localizado na zona urbana do município de Mossoró, Brasil.



Fonte: Maria Carolina Ramirez, 2020.

2.2 Análises Microbiológicas

Pesquisou-se nas amostras de saburá os microrganismos: Bactérias mesófilas totais, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Salmonella* spp., bolores e leveduras e bactérias ácido lácticas. Inicialmente foram pesadas 25 gramas de cada amostra coletada. Em seguida esse material foi diluído em 225 mL de água peptonada estéril (diluição 10^{-1}). Em seguida foram realizadas diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo água peptonada estéril até alcançar a diluição 10^{-3} . As diluições produzidas foram utilizadas para todas as análises microbiológicas avaliadas. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

2.2.1 Contagem de bactérias mesófilas totais

Para contagem de bactérias mesófilas totais foi seguido o protocolo estabelecido por Maturin e Peeler (1998) com adaptações. Em placas de petri estéreis foi inoculado 1 ml das diluições previamente obtidas. Em seguida pela técnica de *pour plate* as placas foram preenchidas com ágar padrão para contagem (PCA) a 45 °C. Após o enrijecimento do ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.2.2 Detecção e contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

Para detecção e contagem de coliformes totais e *E. coli*, foi seguida a metodologia estabelecida por Manafi e Kneifel (1989) com modificações. As diluições 10^{-1} a 10^{-3} obtidas foram semeadas pela técnica *spread plate* em placas de ágar cromogênico *Hicoliform* para detecção rápida de coliformes e *E. coli*. As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Após o período de incubação foram contadas as unidades formadoras de colônia características de coliformes totais (colônias azul-esverdeadas). Para detecção de *E. coli*, adicionou-se 3 gotas de reagente de Kovacs nas colônias consideradas suspeitas. Foram consideradas positivas para *E. coli* as colônias que apresentaram fenótipo avermelhado após 2 minutos do uso do reagente de Kovacs. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

2.2.3 Contagem de *Staphylococcus* sp.

Para contagem de *Staphylococcus* sp. foi seguida a metodologia sugerida por Tallent *et al.*, (1998) com adaptações. Foram preparadas placas de ágar Baird-Parker enriquecido com gema de ovo e telurito a 1%. Inoculou-se nas placas 100 µl das diluições 10^{-1} a 10^{-3} pela técnica *spread plate*. As placas foram incubadas a 37 °C durante 48h. Foram consideradas para contagem as colônias pretas, brilhantes, convexas, cercadas por zona clara e/ou uma borda opaca (colônias características de *Staphylococcus* sp). Os resultados foram expressos em log UFC/g.

2.2.4 Detecção de *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella* spp. foi seguido o protocolo ISO 6579:2007 com adaptações. A diluição 10^{-1} de cada amostra foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C por 20 horas. Em seguida alíquotas dessa diluição foram transferidas para os caldos Rappaport-Vassiliadis, Tetracionato e Selenito-Cistina por 24 horas a 41 °C em banho-maria. Posterior ao período de incubação, com o auxílio de alças de transferência descartáveis, os caldos foram repicados para placas de Petri preparadas previamente com ágar manitol lisina violeta cristal verde brilhante (MLCB) e ágar xilose lisina desoxicolato (XLD). O material foi incubado a 37 °C por 24 horas. As colônias características foram repicadas para tubos contendo ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e ágar lisina ferro (LIA) e incubadas por 24 horas a 37 °C. As amostras

consideradas positivas (LIA de coloração inalterada e TSI com coloração rosa no ápice, amarela no meio e preta no fundo) foram repicadas para tubos com ágar ureia e incubadas a 37 °C por 24 horas. As amostras que não apresentaram reação de clivagem da ureia (substrato rosado) foram consideradas com presença de *Salmonella sp.* em 25g de saburá.

2.2.5 Contagem de Bolores e Leveduras

Para contagem de bolores e leveduras foi seguida a metodologia proposta por Tournas *et al.*, (1998). Foram preparadas placas de Petri contendo meio ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico. As placas foram inoculadas através da técnica de *spread plate* com 100 µl das diluições obtidas e foram incubadas a 25 °C durante cinco dias. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.2.6 Contagem de bactérias ácido lácticas viáveis

A contagem de bactérias lácticas viáveis foi realizada de acordo com a técnica estabelecida por De Man, Rogosa e Sharpe (1960) com modificações. Alíquotas de 1 ml das diluições foram pipetadas em placas de Petri previamente esterilizadas, posteriormente as placas foram cobertas com uma camada de ágar MRS a 45 °C. Após o endurecimento do meio, uma sobrecamada do ágar MRS foi adicionada às placas, visando a criação de uma atmosfera de 15% de CO₂. Logo após, as placas foram incubadas a 30 °C por 5 dias. Os resultados da contagem foram expressos em log UFC/g.

2.3 Análises Físico-químicas

2.3.1 Espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS)

As análises físico-químicas de matéria seca, matéria mineral (cinzas), proteína bruta, extrato etéreo, açúcares totais e fibras em detergente neutro (fibras) foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Precisão da UFERSA através da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS), com amplitude de 1200 a 2400nm. Foi utilizado um espectroscópio da marca Unity, modelo SpectraStar 2400. Os resultados obtidos foram calculados com base na matéria seca e expressos em g/100 g.

2.3.2 pH e acidez livre

Para avaliar o pH foram pesadas 10 gramas de saburá, essa amostra foi diluída em 75 mL de água destilada, em seguida o pH foi aferido através de pHmetro de bancada, previamente calibrado (IAL, 2008).

Após aferido o pH, as amostras foram tituladas com hidróxido de sódio (NaOH) 0,05 N até a neutralização (pH = 8,5). Para calcular os valores da acidez livre foi utilizado a fórmula. Acidez livre = [(mL de NaOH utilizado - mL branco) x 50 x fator de correção]/massa da amostra. Os resultados foram expressos em mEq/Kg.

2.3.2 Análises estatísticas

Os resultados referentes à contagem de microrganismos e composição físico-química foram expressos em valores de média e desvio padrão e expostos por meio de tabelas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A microbiologia do saburá da abelha jandaíra

Através dos resultados obtidos foi possível constatar a contagem de microrganismos nas amostras de saburá analisadas permaneceu abaixo do limiar de detecção do método utilizado (tabela 01). A baixa contaminação microbiana das amostras de saburá de *M. subnitida* são um indicativo que os processos bioquímicos e microbianos gerenciados pelas abelhas são eficientes em inibir a deterioração deste produto (MENEZES *et al.*, 2013; ALVES; SODRÉ; CARVALHO, 2018).

Tabela 1. Microrganismos pesquisados no saburá *in natura* de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) coletados em zona urbana e rural do município de Mossoró, Brasil.

Microrganismos							
	Bactérias Mesófilas	Coliformes totais	<i>E. coli</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i> *	Bolores e leveduras	Bactérias ácido lácticas
S1	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48
S2	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48
S3	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48

S4	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48
S5	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48
S6	< 1,48	< 1,3	< 1,3	< 1,3	Ausente	< 1,18	< 1,48

Resultados expressos em Log₁₀ UFC/g. *Resultados expressos em Ausência/Presença

A baixa contaminação microbiana, em especial de enterobactérias, encontrada nas amostras de saburá são um indicativo de que este produto é um alimento seguro para o consumo humano. Algumas espécies de abelhas sem ferrão são conhecidas pelo seu comportamento não higiênico de levar contaminação ambiental para dentro da colmeia, a ausência desse tipo de contaminados indica que a possível contaminação não afeta negativamente a qualidade do produto (NOGUEIRA-NETO, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2018; PARPINELLI *et al.*, 2021).

A técnica de adicionar microrganismos fermentadores, adição de mel, néctar de plantas e secreções enzimáticas de abelha para produção de pólen fermentado é observada tanto em abelhas do gênero *Apis* como em meliponíneos. Anderson e colaboradores (2014) identificou que após 96 horas de coletado e armazenado reduz consideravelmente a carga microbiana do pólen das abelhas *Apis mellifera* devido às modificações bioquímicas e microbiológicas propiciadas, preservando-o dessa forma por longos períodos.

O sucesso da técnica na preservação do pólen de abelhas *Apis* e meliponíneos deve-se em grande parte pela flora microbiana adicionada por essas abelhas ao pólen ainda fresco ao chegar na colmeia. As leveduras e bactérias ácido lácticas são reconhecidamente os microrganismos responsáveis por exercer a fermentação do pólen estocado (MOHAMMAD; MAHMUD-AB-RASHID; ZAWAWI, 2021).

O fato de não haver sido detectado crescimento microbiana no saburá da abelha jandaíra é um indicativo de que as amostras coletadas já haviam finalizado seu processo de transformações bioquímicas e microbiológicas (ALVES; SODRÉ; CARVALHO, 2018).

As amostras analisadas neste estudo foram coletadas de potes de pólen que já haviam passado pelo processo de fermentação e estavam prontos para o consumo. Um estudo mais aprofundado que busque avaliar como ocorre todo o processo desde a coleta do pólen no ambiente, a fermentação e interação entre microrganismos e enzimas com o substrato até o resultado final são necessários para elucidar o processo.

3.2 Características físico-químicas do saburá da abelha jandaíra e implicações legais

O saburá da abelha jandaíra apresentou-se como um alimento ácido e rico em proteínas e carboidratos (Tabela 2). O saburá das abelhas sem ferrão é rico em proteínas e é utilizado como a principal fonte proteica para o desenvolvimento das abelhas devido ao alto teor de aminoácidos essenciais em sua composição (MICHENER, 1969; MOHAMMAD; MAHMUD-AB-RASHID; ZAWAWI, 2021).

Tabela 2. Características físico-químicas do *saburá* in natura de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) coletados em zona urbana e rural do município de Mossoró, Brasil.

Parâmetros	Saburá de <i>M. subnitida</i>	Legislação apícola ¹	Legislação sugerida ²
Umidade (g/100 g)	27,2 ± 2,9	≤ 30	≤ 55
Cinzas (g/100 g)	3,0 ± 0,1	≤ 4	≤ 4
Proteína bruta (g/100 g)	31,1 ± 2,8	≥ 8	≥ 8
Extrato etéreo (g/100 g)	4,6 ± 0,5	≥ 1,8	≥ 1,8
Açúcares totais (g/100 g)	55,2 ± 2,3	14,5 a 55	10 a 60
Fibras (g/100 g)	2,1 ± 0,3	≥ 2	≥ 2
pH	3,5 ± 0,5	4 a 6	3 a 6
Acidez livre (mEq/kg)	1023,7 ± 30,3	≤ 300	≤ 1500

Resultados apresentados em média ± desvio padrão (n=6). ¹ Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001; ² Limites sugeridos pelo autor para o saburá de *M. subnitida*.

De acordo Anderson e colaboradores (2014), mesmo após o processo de fermentação, o teor de nutrientes, principalmente de proteínas e aminoácidos livres, no pólen das abelhas não é alterado, dessa forma as características nutricionais do produto são mantidas.

O teor de umidade encontrado nas amostras de saburá de *M. subnitida* não diferiu significativamente do valor encontrado em outras espécies de abelha sem ferrão e de *Apis mellifera* se enquadrando no limite exigido pela legislação de produtos apícolas brasileira (BRASIL, 2001).

Porém, todas as amostras utilizadas neste estudo foram coletadas durante a estação seca da região semiárida do estado do Rio Grande do Norte. Características vegetais e climáticas podem influenciar o teor de umidade presente no saburá devido a ele ser um alimento higroscópico (ALVES; SODRÉ; CARVALHO, 2018). Portanto, a umidade estabelecida na legislação federal pode ser um entrave para a comercialização do saburá *in natura* como alimento e necessita ser adequada para que o saburá seja fiscalizado corretamente como alimento.

O processo de secagem já estabelecido para o pólen das abelhas *Apis mellifera* pode ser eficaz como metodologia para adequar o teor de umidade do saburá das abelhas sem ferrão. Porém o aquecimento do saburá pode propiciar a volatilização de compostos nutricionais. O uso dessa metodologia deve ser cauteloso (BARAJAS; CORTES-RODRIGUEZ; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, 2011; MELO *et al.*, 2016).

O teor de cinzas, extrato etéreo e fibras encontrados no saburá da abelha jandaíra não diferiram dos requisitos exigidos pela legislação federal. A quantidade desses compostos no saburá depende da flora circundante utilizada pelas abelhas para coleta de pólen (THAKUR; NANDA, 2020).

O teor de açúcares totais encontrados no saburá excedeu de forma sutil o limiar permitido pelo regulamento técnico brasileiro de qualidade do pólen. Mohammad, Mahmud-Ab-Rashid e Zawawi (2021) identificaram que o teor de carboidratos no saburá das abelhas sem ferrão pode variar entre 10,85 e 59,94 g/100 g. De acordo com os mesmos autores, os carboidratos também são constituintes majoritários do saburá dos meliponíneos devido à adição de néctar ou mel durante a transformação do pólen coletado em saburá.

De acordo com a literatura, o teor de açúcares encontrados no saburá de jandaíra está dentro dos padrões encontrados para outras abelhas sem ferrão e se faz necessário a adequação desse quesito na legislação para que este produto seja avaliado e fiscalizado corretamente.

Dois parâmetros cruciais que diferenciam o saburá das abelhas sem ferrão para o pólen das abelhas *Apis* é o pH e a acidez desses produtos. Neste estudo foi possível identificar que o saburá mostra-se como um alimento de pH 3,5 e acidez em média de 1023,7 mEq/kg. Ambos os parâmetros se encontram não conformes com o regulamento técnico de identidade e qualidade do pólen apícola.

A acidez encontrada no saburá de abelha jandaíra mostrou-se 3 vezes mais elevada do que o limite permitido pela legislação de 300 mEq/kg. Porém o alto teor de acidez é uma característica do saburá das abelhas sem ferrão devido aos processos fermentativos que ocorrem durante o processo de estocagem do produto. Pinheiro *et al.* (2007) encontraram resultados de acidez semelhantes para as espécies *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata*.

De acordo com os autores acima citados o saburá *in natura* dessas espécies de abelha sem ferrão apresentaram 1380 e 1781 mEq/kg respectivamente. Os valores de pH encontrado por estes autores também se mostrou semelhante ao encontrado nesta pesquisa para o saburá de abelha jandaíra. Os valores de pH para o saburá de *M. fasciculata* e *M. flavolineata* foram 3,42 e 3,8 respectivamente.

Os dados encontrados nesta pesquisa e na literatura são um indicativo de que o pH abaixo de 4 e acidez acima de 1000 mEq/kg são características inerentes ao saburá das abelhas do gênero *Melipona* e adequações devem ser realizadas para que esses produtos sejam avaliados de forma adequada.

Na Tabela 01 também consta uma sugestão de legislação para a correta caracterização, avaliação e comercialização do saburá *in natura* de *Melipona subnitida*. De acordo com Alves e Carvalho (2018), a inclusão do saburá como produto comercial exige a padronização de suas características e os critérios que orientam este regulamento devem ser baseados principalmente nas características que o distinguem do pólen de abelha *Apis* (umidade, pH e acidez).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O saburá da abelha jandaíra mostrou-se como um alimento rico em proteínas e carboidratos e seguro para o consumo humano devido ao baixo teor de microrganismos nele encontrado. Porém, para que sua produção e comercialização seja impulsionada é necessário que haja a regulamentação deste produto para que ele seja fiscalizado adequadamente.

REFERÊNCIAS

- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L. Pot-Pollen 'Samburá' Marketing in Brazil and Suggested Legislation. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Eds.). **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Springer International Publishing, p. 435–443, 2018.
- ALVES, R. M. O.; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. Chemical, Microbiological, and Palynological Composition of the 'Samburá' *Melipona scutellaris* Pot-Pollen. In: VIT, P.; PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. (Eds.). **Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology**. Springer International Publishing, p. 349–360, 2018.
- ANDERSON, K. E.; CARROLL, M. J.; SHEEHAN, T.; MOTT, B. M.; MAES, P.; CORBY-HARRIS, V. Hive-stored pollen of honey bees: many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Molecular Ecology**, [S.L.], v. 23, n. 23, p. 5904–5917, 2014.
- BARAJAS, J.; CORTES-RODRIGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E. Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of colombia. **Journal of Food Process Engineering**, [S.L.], v. 35, n. 1, p. 134–148, 2011.
- BRASIL. **Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis. Diário Oficial [da União], Brasília, DF, Seção 1, p. 18, 2001.

DANTAS, M. C. A. M.; BATISTA, J. L.; DANTAS, P. A. M.; DANTAS, I. M.; DIAS, V. H. P.; ANDRADE FILHO, F. C.; MOREIRA, J. N.; MIELEZRSKI, G. L. N.; SILVA, M. G.; MAIA, A. G.; MEDEIROS, A. C.; MARACAJÁ, P. B. Stingless bee and its socioeconomic potential in the States of Paraíba and Rio Grande do Norte. **Research Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e3309107939, 2020.

DOMÍNGUEZ, C. M. Z.; BERMUDEZJ, C. S.; QUICAZÁN, C. M. C. Valorization alternatives of colombian bee-pollen for its use as food resource - a structured review. **Vitae**, v. 21, n. 3, p. 237-247, 2014.

HAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: a review. **Trends in Food Science & Technology**, [S.L.], v. 98, p. 82-106, abr. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos físico-químicos para análises de alimentos. 4ª ed. (1ª Edição digital), 1020 p., 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579**: Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of Salmonella spp. 4th ed. Geneva, 2002. Amendment 1: 15 jul. 2007.

KIELISZEK, M.; PIWOWAREK, K.; KOT, A. M.; BIAŚEJAK, S.; CHLEBOWSKA-ŚMIGIEL, A.; WOLSKA, I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 170-180, 2018.

MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W. A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water. **International journal of hygiene and environmental medicine**, v. 189, n. 3, p. 225–234, 1989.

MATURIN, L.; PEELER, J. T. **Aerobic Plate Count**. In: Bacteriological Analytical Manual Online, 1998.

MELO, A. A. M.; ESTEVINHO, M. L. M. F.; SATTTLER, J. A. G.; SOUZA, B. R.; FREITAS, A. S.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. **LWT**, v. 65, p. 808-815, 2016.

MICHENER, C. D. Comparative Social Behavior of Bees. **Annual Review of Entomology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 299-342, 1969.

MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD-AB-RASHID, N. K.; ZAWAWI, N. Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): chemical and microbiology properties and health benefits. **Molecules**, [S.L.], v. 26, n. 4, p. 957, 2021.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 446p., 1997.

OLIVEIRA, J. J.; RIBEIRO, H. Food market trends: the cases of spirulina and bee pollen. In: RIBEIRO, H. N. R.; COSTA, M. A. S.; CEHOK, I. (ed.). **Economic and Social Development**. Aveiro: Varazdin Development And Entrepreneurship Agency, p. 246-258, 2020

PARPINELLI, R. S.; LIMA, E. G.; ANJO, F. A.; ALMEIDA, L. M.; MARÇO, P. H.; TOLEDO, V. A. A. Microbiological characteristics of meliponine honey marketed in the State of Paraná – Brazil. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e6710111381, 2021.

PINHEIRO, F. M.; COSTA, C. V. P. N.; BAPTISTA, R. C.; VENTURIERI, G. C.; PONTES, M. A. N. **Pólen de abelhas indígenas sem ferrão *Melipona fasciculata* e *Melipona flavolineata*: caracterização físico-química, microbiológica e sensorial**. In: ENCONTRO DE PROFISSIONAIS DA QUÍMICA DA AMAZÔNIA, 10., 2007, Belém, PA. Recursos naturais: uma reflexão para os profissionais da química. Belém, PA: Conselho Regional de Química da 6ª Região, 2007.

RODRIGUES, C. S.; FERASSO, D. C.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; GRANDO, R. C.; TREICHEL, H.; COELHO, G. C.; MOSSI, A. J. Quality of Meliponinae honey: pesticides residues, pollen identity, and microbiological profiles. **Environmental Quality Management**, v. 27, n. 4, p. 39-45, jun. 2018.

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; SILVA LINS, A. C.; JOSÉ MARIA BARBOSA-FILHO; SILVA, E. M. S.; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. A. R. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6, p. 507–511, 2006.

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P.; RODRIGUES, A. E.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G. S.; NOVAIS, J. S.; SANTOS, F. A. R.; CAMARA, C. A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013.

TALLENT, S.; HAIT, J.; BENNETT, R.W.; LANCETTE G.A. ***Staphylococcus aureus***. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. **Yeasts, molds and mycotoxins**. In: Bacteriological Analytical Manual Online. 1998. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

VILLAS-BÔAS, J. K. **Manual de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas sem Ferrão**. 2. ed. Brasília – DF, Instituto Sociedade, População e Natureza, 212 p., 2018.

VIT, P.; SANTIAGO, B.; PEDRO, S.; PEREZPEREZ, E.; PENAVERA, M. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 28, n. 2, p. 78, 2016.