

Artigo Científico

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO MEL DE *Melipona* sp. PRODUZIDO NA
AMAZÔNIA CENTRAL (PARINTINS – AM – BRASIL)**

Italo Thiago Silveira Rocha Matos

Mestre em Diversidade Biológica pela Universidade Federal do Amazonas (2010), graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Roraima (2006). Atualmente é Professor Assistente I da Universidade Federal do Amazonas
E-mail: italo_matos@ufam.edu.br

Marcelo Tavares Nunes

Discente do curso de Zootecnia da Universidade Federal do Amazonas, no Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia (Parintins-AM).
E-mail: celinho_tn@hotmail.com

Diego Azevedo Mota

Possui Graduação e Mestrado em Zootecnia pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp - Campus de Jaboticabal
E-mail: diegomota@zootecnista.com.br

Monyka Marianna Massolini Laureano

Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal (2004), Mestrado (2006) e Doutorado (2008) em Genética e Melhoramento Animal pela Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Campus de Jaboticabal. Atualmente é professor adjunto da Universidade Federal do Amazonas, Campus de Parintins. E-mail: monyka_zoo@yahoo.com.br

Márcio Aquio Hoshiba

Possui graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (2004), Mestrado (2007) e Doutorado (2011) em Zootecnia pela mesma instituição. Atualmente é professor da Universidade Federal do Pampa
E-mail: tokudazoo@gmail.com

Resumo - Quinze amostras de mel foram coletadas diretamente das colméias em diferentes meliponários nas zonas rural e urbana do município de Parintins. Bolores e leveduras foram quantificados por contagem em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose (pH 3,5), incubadas por até sete dias. Coliformes totais e termotolerantes foram quantificados pela técnica de fermentação em tubos múltiplos, determinando-se a seguir o número mais provável por grama. Bolores e leveduras ocorreram em média de $71,9 \times 10^2$ Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC/mL). Fungos filamentosos ocorreram em 80% amostras (média de $2,8 \times 10^2$ UFC/mL), enquanto leveduras ocorreram em 100% das amostras (média de $62,2 \times 10^2$ UFC/mL). Cinco amostras (33,33%) apresentaram contaminação por coliformes totais e termotolerantes, sendo que três destas encontravam-se dentro dos limites tolerados pela legislação em vigor. A análise estatística demonstrou não haver relação entre a qualidade microbiológica das amostras e o tipo de ambiente (rural ou urbano) na qual foram coletadas. O coeficiente de correlação de Pearson (0,89; $p=0,000$) demonstrou correlação entre os quantitativos de bolores e leveduras e coliformes. A contagem de microrganismos obtida no início da safra sugere relação entre qualidade microbiológica e disponibilidade de flores às abelhas.

Palavras-chave: mel, coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras

**MICROBIOLOGICAL QUALITY OF HONEY FROM *Melipona* sp. PRODUCED IN
CENTRAL AMAZON RAINFOREST (PARINTINS-AM-BRAZIL)**

Abstract - Fifteen samples of honey were collected directly from the hives in different meliponary at rural and urban areas of Parintins County. Molds and yeasts were quantified by counting in Petri dishes containing potato dextrose agar (pH 3.5) and incubated for until seven days. Total and thermotolerant coliforms were quantified by the technique of multiple tube fermentation, then determining the most probable number per gram. Molds and yeasts occurred an average of 71.9×10^2 colony forming units per gram (CFU/mL). Filamentous fungi occurred in 80% samples (average of 2.8×10^2 CFU/mL), while yeasts occurred in 100% of the samples (average of 62.2×10^2 CFU/mL). Five samples (33.33%) had total coliforms and thermotolerant, and three of these were within the limits tolerated by law. Statistical analysis showed no relationship between the microbiological quality of samples and the type of environment (rural or urban) in which it was collected. The Pearson correlation coefficient (0.89, $p = 0.000$) demonstrated a correlation between the amounts of molds and yeasts and coliforms. The highest count of microorganisms in the beginning of the season suggests a relationship between microbiological quality and availability of flowers to bees.

Key-words: honey, total and thermotolerant coliforms, molds and yeasts

INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural, resultante do processamento do néctar das flores e de outras partes extraflorais pelas abelhas. Este produto é amplamente consumido devido ao seu sabor agradável e por representar uma importante fonte de energia (ALVES et al., 2009). Constitui também um importante suplemento alimentar que, ultimamente, vem sendo bastante consumido devido, principalmente, às suas diversas propriedades benéficas à saúde, como atividade antimicrobiana, propriedades cicatrizantes e antioxidantes. Estas têm despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos (GONÇALVES et al., 2005).

Segundo Vargas (2006), o mel contém uma mistura complexa de carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, cera e grãos de pólen. Ao todo já foram encontradas mais de 180 substâncias em diferentes tipos de mel. Sua composição, cor, aroma e sabor podem ser bastante variados, dependendo principalmente das floradas, regiões geográficas e condições climáticas. Outros fatores que interferem na qualidade do mel são condições climáticas, estado de maturação, espécie da abelha e condições de processamento e armazenamento (SILVA et., 2004). A produção brasileira de mel tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. Em 2008 foram produzidas mais de 37.000 toneladas de mel, das quais 18.000 foram destinadas ao mercado externo. Em 2009 as exportações cresceram para 26.000 toneladas (+44,4%), refletindo o crescimento deste setor no Brasil (ANANIAS, 2010). A produção de mel no estado do Amazonas corresponde a 0,05% da produção nacional. Ações governamentais têm sido empreendidas a fim de incentivar a produção familiar de mel. Neste contexto, o município de Parintins ocupa posição de destaque.

O município de Parintins localiza-se no extremo leste do estado do Amazonas, fazendo fronteira com o estado do Pará. O marco zero do município localiza-se a 56°73' W e 2°62' S. O turismo e a agropecuária são suas principais atividades econômicas, com destaque para bovinocultura, bubalinocultura e pesca (BRASIL, 2010). A produção de mel tem se constituído uma atividade alternativa aos moradores das zonas rurais e urbanas no município. Segundo Couto (2005), serão implantadas 4000 unidades familiares de criação de abelhas, sendo cada uma delas constituída por uma colônia de *Apis sp.* e duas de *Melipona sp.* Os produtores rurais têm no mel de *Melipona sp.*, além de um

implemento da medicina popular, uma fonte alternativa de renda. O mel é coletado e engarrafado artesanalmente, sendo comercializado pelos produtores em feiras locais. Esta atividade não passa por qualquer tipo de controle sanitário pelos órgãos competentes.

Devido suas características físicoquímicas (pH, teor de umidade, potencial de óxidorredução, constituintes antimicrobianos), o mel é um produto que não apresenta susceptibilidade à proliferação de microrganismos. A despeito deste fato, fatores externos podem influenciar negativamente sua qualidade final, entre eles a ocupação humana e higiene das áreas no entorno do meliponário, o que compromete a qualidade do alimento coletado pelas abelhas nas áreas de forrageio. Baixas contagens e poucos tipos de microrganismos são esperados nesse substrato, como os esporulados, bolores e leveduras que, em condições normais de umidade, não interferem na qualidade do mel e não são patogênicos, sendo considerados microrganismos indicadores (ANANIAS, 2010). Bogdanov (2005) enfatiza que bactérias do gênero *Clostridium* merecem atenção especial, haja vista o risco que podem representar a saúde. Outro fator pouco considerado é o período do ciclo produtivo. A época da estação de florada pode interferir na qualidade microbiológica do mel já que, na baixa disponibilidade de alimentos, as abelhas podem forragear em colônias fúngicas (SNOWDOWN, 1999) ou mesmo em fezes e outras fontes de matéria orgânica (NOGUEIRA NETO, 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do mel de *Melipona sp.* produzido no município de Parintins, verificando a correlação entre os diferentes tipos de microrganismos indicadores, a relação entre a qualidade e o tipo de ambiente (rural ou urbano) em que se encontram os meliponários, e fazer inferências sobre a influência do período na qualidade microbiológica do mel.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas quinze amostras de mel entre setembro de 2010 e abril de 2011, período que, segundo os produtores, corresponde à safra do mel na região. Dentre estas amostras, sete foram obtidas na zona rural e oito dentro do perímetro urbano de Parintins. Os pontos de coleta foram georreferenciados com GPS (tabela 1). As áreas de forrageio das abelhas foram avaliadas quanto às condições de higiene.

Tabela 1: Descrição das estações de coletas

Estação de coleta	Coordenadas geográficas	Tipo de ambiente
A	2°32'39.33" S / 56°43'39.36" O	Rural
B	2°32'35.69" S / 56°43'54.96" O	Rural
C	2°31'23.73" S / 57°00'37.57" O	Rural
D	2°38'41.56" S / 56°45'39.36" O	Urbana
E	2°40'59.77" S / 56°43'37.81" O	Urbana
F	2°38'26.93" S / 56°43'38.70" O	Urbana
G	2°39'19.33" S / 56°44'55.68" O	Urbana
H	2°38'09.90" S / 56°45'07.93" O	Urbana

Artigo Científico

O mel foi coletado por aspiração com seringa estéril diretamente dos ninhos de *Melipona sp.*, sendo a amostra de cada ponto composta por cerca de 100mL. O mel foi acondicionado em frascos esterilizados e mantido sob refrigeração (4 °C) até o início das análises, em interstício de tempo inferior a quatro horas. Cada amostra foi identificada por número seqüencial (Tabela 2).

Tabela 2: Período e estação de coleta de cada amostra

Número de amostra	Período	Estação de coleta
1	Setembro/2010	A
2	Setembro/2010	B
3	Setembro/2010	D
4	Outubro/2010	E
5	Outubro/2010	F
6	Novembro/2010	H
7	Novembro/2010	C
8	Janeiro/2011	A
9	Fevereiro/2011	C
10	Fevereiro/2011	C
11	Março/2011	F
12	Março/2011	F
13	Abril/2011	C
14	Mai/2011	G
15	Mai/2011	G

Bolores e leveduras foram quantificados por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placas de Petri contendo Agar Batata Dextrose adicionado de ácido tartárico 10% (15 mL/L; pH 3,5). Foram inoculados 100µL da amostra diluída à concentração 10^{-2} , procedendo ao espalhamento com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 25 °C por até sete dias. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Para enumeração de bactérias do grupo coliforme, o teste presuntivo foi executado inoculando-se 1,0 mL da amostra diluída às concentrações 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em tubos contendo 9,0 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (36 °C, 24h). Os testes confirmativos foram executados inoculando-se 1,0 mL do conteúdo dos tubos do teste presuntivo com resultado positivo em 9,0 mL de Caldo Bile Verde Brilhante (36 °C, 24-48h) e Caldo EC (44 °C, 24-48h) para quantificação de coliformes totais e termotolerantes (*Escherichia coli*), respectivamente. Foram considerados positivos os tubos que apresentassem retenção de gás nos tubos de Durham, adicionados aos meios em posição invertida. Os resultados foram usados para determinar o Número Mais Provável (NMP) de UFC por mililitro de amostra.

Todas as análises foram executadas segundo a Instrução Normativa n.º 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

A relação causa-efeito entre o tipo de ambiente e a qualidade microbiológica do mel foi verificada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. A correlação entre os quantitativos de cada grupo microbiano foi verificada por índice de correlação de Pearson. A análise estatística foi executada utilizando software Mstat 12 ® (SYSTAT, 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de coliformes totais e termotolerantes demonstrou que um terço das amostras analisadas apresentava contaminação fecal. Embora não necessariamente patogênicas, bactérias do grupo coliforme são microrganismos indicadores. Coliformes totais indicam cuidados com a higiene dos materiais e de manipulação (ALVES et al., 2011). Já a presença de coliformes termotolerantes indica a contaminação com matéria orgânica de origem fecal. A legislação brasileira não exige a análise microbiológica do mel, recomendando apenas que sejam seguidas as práticas de higiene (BRASIL, 2000). Entretanto, o consumo de mel que apresente coliformes termotolerantes deve ser evitado, pois o indicativo de contaminação fecal torna este produto um potencial transmissor de enteroparasitas.

Bolores e leveduras ocorreram em média de $71,9 \times 10^2$ UFC/mL ($\pm 104,9 \times 10^2$). Analisados separadamente, os fungos filamentosos ocorreram em 80% das amostras, com média de $2,8 \times 10^2$ UFC/mL de mel; enquanto as leveduras foram detectadas em 100% das amostras, com média de $62,2 \times 10^2$ UFC/mL.

O teste estatístico de Mann-Whitney demonstrou não haver relação entre o tipo de ambiente (rural ou urbano) e a qualidade microbiológica do mel ($p > 0,05$). O coeficiente de correlação de Pearson (0,89, $p=0,000$) demonstrou haver correlação entre os quantitativos de bolores e leveduras e coliformes termotolerantes.

Os quantitativos por amostra para cada grupo microbiano avaliado podem ser observados Tabela 3.

Tabela 3: Resultados de quantificação de microrganismos indicadores da qualidade do mel

Amostra	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes termotolerantes (NMP/mL)	Bolores e Leveduras (UFC/mL x 10 ²)
1	> 1.100	1.100	402
2	1.030	93	216
3	> 1.100	93	67
4	< 3	< 3	48
5	< 3	< 3	5
6	1.100	210	41
7	23	23	73
8	< 3	< 3	37
9	< 3	< 3	63
10	< 3	< 3	26
11	< 3	< 3	2
12	< 3	< 3	10
13	< 3	< 3	3
14	< 3	< 3	41
15	< 3	< 3	45

A Resolução de Decisão Colegiada 012 (RDC 012), de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos destinados ao consumo humano direto. Considerando que mel não é especificado nos anexos da RDC 012, admite-se que este seja similar a meloço e melado, conforme a referida RDC orienta. Nesse caso, as amostras 1 e 6 encontram-se com o número de coliformes termotolerantes por mililitro de mel acima do tolerado (10² UFC/mL).

Quanto a bolores e leveduras, a RDC 012 é omissa, fazendo menção a esses microrganismos somente para “puros e doces em pasta ou massa e similares, incluindo geleias, não comercialmente estéreis; doces em calda, não comercialmente estéreis” e “alimentos para imunosuprimidos e imunocomprometidos, excluídos os que serão consumidos após adição de líquidos, com emprego de calor”. Em ambos os casos o limite tolerável é 10⁴ UFC/mL. Admitindo o mesmo limite de tolerância para o mel, as amostras 1 e 2 encontram-se impróprias para o consumo humano.

Diversos autores (SODRÉ et al., 2007; SOUZA et al., 2009 e ALVES et al., 2011) adotam como limite tolerável para bolores e leveduras o mesmo valor estabelecido para coliformes termotolerantes (10² UFC/mL). No entanto, admitir este valor pode ser uma atitude temerária, já que bolores e leveduras ocorrem naturalmente associados ao mel (ANANIAS, 2010).

A legislação brasileira é omissa e inespecífica em relação aos quantitativos toleráveis para qualidade microbiológica do mel de abelhas. Este fato merece atenção, já que a participação do Brasil no mercado internacional tem crescido nos últimos anos (ANANIAS, 2010). Face a este crescimento, urge a necessidade de atualização da legislação que regulamenta a qualidade do mel.

Os maiores quantitativos de microrganismos indicadores avaliados foram obtidos no mês de setembro, período no qual as flores são escassas na região. Este fato pode explicar o elevado número de bactérias do grupo coliforme e diferentes tipos de

fungos nas amostras. Barth (2004) argumenta que, nesses períodos, as abelhas podem forragear nos mais diversos substratos, desde colônias fúngicas passando por solo, argila e até mesmo matéria orgânica de origem fecal.

Outro fator que pode ter influenciado a qualidade das amostras de mel é a higiene das áreas de vôo e forrageio das abelhas. Segundo Carvalho-Zilse (2004), algumas espécies de *Melipona* podem coletar néctar e pólen num raio de até 3000 metros do ninho. Por conta disso, é desejável que as áreas próximas aos criadouros sejam livres de outras atividades pecuaristas, tais como a criação de outros animais. As amostras com maior quantitativo de microrganismos (1, 2, 3 e 6) foram coletadas em meliponários que dispunham de potenciais fontes de contaminação no entorno, como fezes de gado bovino e aves.

Analisando mel de trigoníneos produzido no estado da Bahia, Souza et al. (2009) obtiveram 100% de amostras (n=14) com NMP/mL <3 para coliformes totais e termotolerantes. A presença de bolores e leveduras foi detectada em todas as amostras, ocorrendo em média 779,3 UFC/mL. Segundo o autor, não foi detectada correlação entre a qualidade microbiológica e o teor de umidade do mel.

Sereia et al. (2011), obtiveram <3 NMP/mL de coliformes termotolerantes. Bolores e leveduras ocorreram em valores máximos de 1100 UFC/mL em amostras de mel (n=33) de *Apis mellifera*, coletadas no alto Rio Paraná.

Comparado aos valores observados para méis de abelhas africanizadas, a maior quantidade de bolores e leveduras no mel de *Melipona sp.* pode estar associada ao teor de umidade, comumente maior em méis de abelhas indígenas (ALVES et al., 2011). Novos esforços devem ser empreendidos no intuito de identificar a microbiota naturalmente associada ao mel de *Melipona sp.* produzido artesanalmente na Amazônia Central.

Artigo Científico

CONCLUSÕES

1. A maior parte das amostras analisadas encontram-se próprias ao consumo humano. O maior número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos indicadores nos períodos iniciais da safra, quando as flores ainda são escassas, reforça a hipótese de forrageio e coleta em colônias fúngicas, fezes e argila pelas abelhas durante períodos de escassez de alimentos.

2. A presença de bolores e leveduras em amostras isentas de coliformes evidencia ocorrência natural. Entretanto os maiores quantitativos de fungos estão correlacionados à presença de coliformes.

3. A qualidade microbiológica do mel produzido em Parintins não está relacionada ao tipo de ambiente (rural ou urbano) em que se localizam os meliponários.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Apoio a Iniciação Científica da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – PAIC / FAPEAM. Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas – PIBIC / UFAM

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, E.M.; Toledo, V.A.A.; Marchini, L.C.; Sereia, M. J.; Moetia, C.C.C. Presença de coliformes, bolores e leveduras em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas do alto rio Paraná. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p.2222-2224, 2009.

Alves, T.T.L.; Meneses, A.R.V.; Silva, J.N.; Parente, G.D.L.; Holanda Neto, J.P. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde**, Mossoró, v.6, n.3, p.91-97, 2011.

Ananias, K. R. **Avaliação das condições de produção e qualidade de mel de abelha (*Apis mellifera* L.) produzido na microrregião de Pires do Rio, no Estado de Goiás**. Goiânia: UFG, 2010. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos.

Barth, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of honeys, propolis an pollen loads of bees. **Scientia Agricola**, Campinas, v.61, n.3, p.342-350, 2004.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades**. Disponível em <<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>> Acessado em 12 de dezembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 62**, de 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa 11**, de 20 de outubro de 2000.

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

Carvalho Zilse, G. A.; Kerr, W. E. Substituição natural de rainhas fisogástricas e distância de vôo dos machos em Tiuba (*Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854) e Uruçu (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811) (Apidae, Meliponini). **Acta Amazonica**, Manaus, v.34, n.4, p.649-652, 2004.

Couto, Raul (org.). **Plano Municipal de Desenvolvimento Rural Sustentável: Parintins AM, 2005 – 2012**. Manaus: IBAMA / ProVárzea. 2005.

Gonçalves, A.L.; Alves Filho, A.; Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

Nogueira Neto, Paulo. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.

Sereia, M. J.; Alves, E. M.; Toledo, V.A.A.; Marchini, L.C.; Faquinello, P.; Sekine, E.S.; Wielewski, P. Microbial flora in organic honey samples of Africanized honeybees from Parana River islands. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.2, p.462-466, 2011

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

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

Sodré, G.S.; Marchini, L.C.; Moreti, A.C.C.C.; Otsuk, I.P.; Carvalho, C.A.L.; Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado de Ceará. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.4, p.1139-1144, jul-ago, 2007.

Souza, B.A.; Marchini, L.C.; Dias, C.T.S.; Oda-Souza, M.; Carvalho, C.A.L.; Alves, R.M.O.; Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 29(4): 798-802, out.-dez. 2009.

Systat, Software Inc. **MyStat: a student version of SYSTAT**. Version 12.02.00. 2007.

Vargas, T.T. **Avaliação da qualidade do mel produzido nas regiões dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: UEPG, 2006. Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia dos Alimentos.

Recebida em 12/03/2011

Aceito em 12/11/2011