



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GEOVANA PIVETA RIBEIRO

**IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS DO MEL DE TIÚBA  
(MELIPONA COMPRESSIPES FASCICULATA) APÓS  
DIFERENTES PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO:  
CONGELAMENTO, PASTEURIZAÇÃO E MATURAÇÃO**

---

Londrina  
2017

GEOVANA PIVETA RIBEIRO

**IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS DO MEL DE TIÚBA  
(MELIPONA COMPRESSIPES FASCICULATA) APÓS  
DIFERENTES PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO:  
CONGELAMENTO, PASTEURIZAÇÃO E MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sandra Helena Prudencio.  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Wilma Aparecida Spinosa.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribeiro, Geovana Piveta.

IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS DO MEL DE TIÚBA (*Melipona compressipes fasciculata*) APÓS DIFERENTES PROCESSOS DE CONSERVAÇÃO: CONGELAMENTO, PASTEURIZAÇÃO E MATURAÇÃO / Geovana Piveta Ribeiro. - Londrina, 2017.  
133 f.

Orientador: Sandra Helena Prudencio.

Coorientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Abelhas nativas - Tese. 2. Conservação - Tese. 3. Perfil sensorial - Tese. 4. Aceitação - Tese. I. Prudencio, Sandra Helena. II. Spinosa, Wilma Aparecida. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

GEOVANA PIVETA RIBEIRO

**IMPACTO NAS CARACTERÍSTICAS DO MEL DE TIÚBA (MELIPONA  
COMPRESSIPES FASCICULATA) APÓS DIFERENTES PROCESSOS  
DE CONSERVAÇÃO:  
CONGELAMENTO, PASTEURIZAÇÃO E MATURAÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Serviço Social da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Serviço Social.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Helena Prudencio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Cesar Augusto Tischer  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Ligia Bicudo de Almeida Muradian  
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 13 de março de 2017.

Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia e socorro, a minha mãe Maria José, minha irmã Ana Carolina, meu marido Caio e minha avó Deolinda (In memoriam).

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pelo dom da vida e com ela a capacidade para pensar, amar e lutar pela conquista de meus ideais.

À minha família, meu infinito agradecimento, por sempre acreditar em minha capacidade e estar ao meu lado, me fazendo acreditar que posso mais do que imagino.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Sandra Helena Prudencio e coorientadora Prof<sup>a</sup> Wilma Spinosa, por todo o conhecimento transmitido a mim. Vocês foram e são referências profissionais para meu crescimento.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) por compartilharem o conhecimento com tanta dedicação.

Ao Sr. Jerônimo Villas-Bôas e sua equipe pelo fornecimento do mel.

Aos componentes da minha equipe da Análise Descritiva Quantitativa: Ariana Justus, Natalia Cenedesi, Marcela Guelfi, Marcela Moreira Terhaag, Isabela Dias, Vitor Hugo Tsuru, Anna Flavia Veronese, Sabrina Penteado, Bruna Raquel Böger, Mirelli Bianchin, Taina Miranda Destro, Carla Cravo, Danielle Honorato, Thamires Peixoto, Maria Thereza Fernandes e Flavia Ruzon.

A todos os alunos, funcionários e professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela participação no teste de aceitação.

Aos alunos e professores dos outros departamentos da Universidade Estadual de Londrina que disponibilizaram equipamentos, tempo e conhecimento para que esta pesquisa se concretizasse. Prof<sup>o</sup> Cesar Augusto Tischer e a aluna Vanessa Rocha Liberatti pela análise de ressonância magnética nuclear (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, Laboratório Multiusuário de Espectroscopia). Prof<sup>o</sup> Laurival Antônio Vilas Bôas e alunas Priscilla Cardoso e Carla Suzuki pelas análises de identificação microbológica e genética molecular (Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias, Departamento de Biologia Geral). Prof<sup>a</sup> Suzana Lucy Nixdorf e aluno Tiago Madeira pelas análises cromatográficas (Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica, Departamento de Química).

Finalmente, gostaria de agradecer à Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso”.

John Ruskin

RIBEIRO, Geovana Piveta. **Impacto nas características do mel de tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) após diferentes processos de conservação**: congelamento, pasteurização e maturação. 2017. 133 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

Os méis de meliponíneos são muito apreciados por seu sabor e aroma inigualáveis, porém devido ao seu alto teor de umidade podem deteriorar. O mel pode ser conservado por diferentes métodos, o que pode alterar suas propriedades físico-químicas e sensoriais. Com isto, o objetivo do estudo foi avaliar o impacto dos processos de conservação por congelamento, pasteurização e maturação a 20°C ou 30°C por até 180 dias sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do mel de abelha tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) do Maranhão. As características físico-químicas avaliadas foram atividade de água, umidade, pH, acidez, cor, viscosidade, teores de etanol, sólidos solúveis totais, açúcares redutores e hidroximetilfurfural. Análise de ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram empregadas para identificação de alteração na composição química durante o armazenamento do mel pelos diferentes métodos. O congelamento causou a redução na viscosidade e umidade e a pasteurização levou ao aumento do pH do mel. O monitoramento do processo de maturação mostrou que ao final dos 180 dias houve diminuição do pH e aumento de acidez e atividade de água, e não ocorreu diferença significativa nos teores de sólidos solúveis totais e açúcares redutores do mel. A ressonância permitiu identificar a relação direta entre os teores de sacarose e glicose, e de sacarose e glicose na produção de etanol durante a maturação. Houve variação nos conteúdos, determinados por HPLC, de ácido acético, propiônico e succínico durante a maturação. A análise microbiológica indicou presença de *Escherichia coli* e *Candida fermentati* durante o processo de maturação espontânea. Não foi detectada a presença de hidroximetilfurfural em nenhuma das amostras conservadas pelos três métodos. A análise sensorial descritiva indicou que mel pasteurizado ou congelado é caracterizado principalmente pelo aroma e sabor de mel, gosto doce e transparência, enquanto que mel maturado nas duas condições por 180 dias apresenta cor amarela, arenosidade, gosto ácido, aroma e sabor fermentado. O mel conservado por congelamento, pasteurização e maturação nas duas condições é bem aceito sensorialmente, com notas hedônicas superiores a 6,0 (em escala de 10 cm) em todos atributos avaliados. Os diferentes métodos de conservação estudados são eficientes para conservação do mel de *Melipona compressipes fasciculata*.

**Palavras-chave:** Abelhas nativas. Conservação. Perfil sensorial. Aceitação.

IBEIRO, Geovana Piveta. **Impact on the characteristics of tiubic honey (*Melipona compressipes fasciculata*) after different conservation processes**: freezing, pasteurization and maturation. 2017. 133p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Meliponine honeys are much appreciated for their unparalleled flavor and aroma, but due to their high moisture content they can deteriorate. Honey can be preserved by different methods, which may alter its physicochemical and sensory properties. The objective of the study was to evaluate the impact of freezing, pasteurization and maturation processes at 20 °C or 30 °C for up to 180 days on the physicochemical, microbiological and sensorial characteristics of the honey bee (*Melipona compressipes fasciculata*) from Maranhão. The physicochemical characteristics evaluated were water activity, moisture, pH, acidity, color, viscosity, ethanol contents, total soluble solids, reducing sugars and hydroxymethylfurfural. Nuclear magnetic resonance analysis and high performance liquid chromatography (HPLC) were used to identify changes in chemical composition during storage of honey by different methods. Freezing caused a reduction in viscosity and moisture and pasteurization led to an increase in the pH of honey. The monitoring of the maturation process showed that at the end of the 180 days there was a decrease in pH and increase of acidity and water activity, and there was no significant difference in total soluble solids and reducing sugar contents of honey. The resonance allowed to identify the direct relationship between sucrose and glucose contents, and of sucrose and glucose in ethanol production during maturation. There was variation in the content, determined by HPLC, of acetic, propionic and succinic acid during maturation. The microbiological analysis indicated the presence of *Escherichia coli* and *Candida fermentati* during the process of spontaneous maturation. The presence of hydroxymethylfurfural was not detected in any of the samples preserved by the three methods. The descriptive sensorial analysis indicated that pasteurized or frozen honey is characterized mainly by the aroma and flavor of honey, sweet taste and transparency, while honey matured in both conditions for 180 days shows yellow color, grittiness, acid taste, aroma and fermented taste. Honey preserved by freezing, pasteurization and maturation in both conditions is well accepted sensorially, with hedonic notes higher than 6.0 (in 10 cm scale) in all evaluated attributes. The different conservation methods studied are efficient for the conservation of *Melipona compressipes fasciculata* honey.

**Key words:** Native bees. Conservation. Sensory profile. Acceptance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alojamento “LÜNEBURGER-STÜLBER” para abelhas.....	19
Figura 2 – Atividade apícola nos últimos 30 anos.....	20
Figura 3 – Participação dos principais estados na produção do mel brasileiro (%).....	21
Figura 4 – Exportação do mel brasileiro entre 2009 e 2013 (toneladas). ....	21
Figura 5 – Abelha Tiúba ( <i>Melipona compressipes fasciculata</i> ). ....	22
Figura 6 – Provável mecanismo de formação do hidroximetilfurfural. ....	28
Figura 7 – Esquema de cromaticidade do sistema CIELAB.....	30
Figura 8 – Fluxograma da metodologia de trabalho.....	35
Figura 9 – Projeções dos parâmetros físico-químicos (A) e amostras de mel tratadas por diferentes métodos de conservação (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPII).....	51
Figura 10 – Monitoramento do pH durante os 180 dias de maturação.....	54
Figura 11 – Monitoramento da umidade e viscosidade durante os 180 dias de maturação. ....	55
Figura 12 – Classificação representativa da cor do mel de acordo com a escala de <i>Pfund</i> durante os 180 dias de maturação. ....	58
Figura 13 – Projeções dos compostos (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPII). ....	60
Figura 14 – Espectros da ressonância magnética nuclear das amostras tempo inicial (A) e pasteurizada (B). ....	62
Figura 15 – Cromatograma de ácidos orgânicos (A) e <i>zoom</i> no cromatograma de ácidos orgânicos com picos dos padrões sobrepostos às amostras (A).(B).....	66
Figura 16 – Cromatograma de açúcares. ....	68
Figura 17 – Gel representativo dos fragmentos amplificados da região ITS-1 e ITS-4 das amostras isoladas do mel congelado por 180 dias (1), maturado a 20±5°C por 90 dias (2) e maturado a 30±5°C por 90 dias (3).....	69
Figura 18 – Gel representativo dos fragmentos amplificados da região FD1 e RD1 das amostras isoladas no meio MYP do mel congelado por 180 dias (1) e maturado a 30±5°C por 180 dias (2) e isoladas do meio MRS do mel congelado por 180 dias (3), maturado a 20±5°C por 180 dias (4) e maturado a 30±5°C por 180 dias (5). ....	70
Figura 19 – Projeções dos atributos sensoriais (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial.....	73
Figura 20 – Projeções dos atributos sensoriais (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPIII). ....	74

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Maiores produtores de mel no mundo.....	19
Quadro 2 – Classificação de cor do mel de acordo com a escala de <i>Pfund</i> .....	38
Quadro 3 – Termos descritores e suas respectivas definição e referências. ....	43
Quadro 4 – Ficha para análise descritiva quantitativa. ....	45
Quadro 5 – Ficha para teste de aceitação.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização físico-química de méis de diferentes abelhas no Brasil. ....	25
Tabela 2 – Coeficientes de correlação entre os parâmetros físico-químicos. ....	52
Tabela 3 – Características físico-químicas das amostras de mel. ....	53
Tabela 4 – Parâmetros de cor das amostras de mel. ....	57
Tabela 5 – Valores de absorvância a 560nm para as amostras mel. ....	57
Tabela 6 – Coeficientes de correlação para os dados da ressonância magnética nuclear. ....	61
Tabela 7 – Conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. ....	63
Tabela 8 – Valores de cobertura, <i>E-value</i> e identidade obtidos em comparação ao banco de dados. ....	70
Tabela 9 – Coeficientes de correlação entre os atributos sensoriais. ....	76
Tabela 10 – Intensidade média de atributos sensoriais de amostras de mel congelada, pasteurizada, maturada a 20±5°C e a 30±5°C. ....	77
Tabela 11 – Intensidade média de atributos sensoriais de amostras de mel congelada, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a 20±5°C e a 30±5°C. ....	79

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>18</b>
3.1	HISTÓRICO DA PRODUÇÃO E USO DO MEL.....	18
3.1.1	Mundial .....	18
3.1.2	No Brasil .....	19
3.2	ABELHAS MELIPONÍNEAS.....	22
3.3	Produção .....	23
3.4	Classificação .....	23
3.5	Composição.....	24
3.5.1	Umidade.....	25
3.5.2	Açúcares .....	25
3.5.2.1	Sacarose Aparente .....	26
3.5.3	Sólidos Insolúveis .....	26
3.5.4	Cinzas .....	26
3.5.5	Acidez .....	27
3.5.6	Hidroximetilfurfural (HMF) .....	27
3.6	Propriedades Terapêuticas.....	28
3.7	Características Sensoriais .....	29
3.8	Beneficiamento para Conservação .....	31
3.8.1	Refrigeração .....	31
3.8.2	Desumidificação.....	31
3.8.3	Pasteurização .....	31
3.8.4	Maturação .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1	MATERIAL.....	34
4.2	MÉTODOS .....	34
4.2.1	Delineamento Experimental Análises Físico-Químicas.....	34
4.2.1.1	Açúcares Redutores.....	36

4.2.1.2	Álcool .....	36
4.2.1.3	Umidade.....	36
4.2.1.4	Sólidos Solúveis Totais .....	36
4.2.1.5	pH .....	37
4.2.1.6	Acidez Total Titulável .....	37
4.2.1.7	Hidroximetilfurfural .....	37
4.2.1.8	Atividade de Água .....	37
4.2.1.9	Viscosidade.....	37
4.2.1.10	Cor .....	38
4.2.1.11	Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	38
4.2.1.12	Análise de Ácidos Orgânicos e Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	39
4.2.2	Análises Microbiológicas .....	39
4.2.2.1	Purificação da microbiota .....	39
4.2.2.2	Extração do DNA Genômico de Bactérias.....	40
4.2.2.3	Extração do DNA Genômico de Leveduras .....	40
4.2.2.4	Identificação molecular das bactérias por reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR) .....	41
4.2.2.5	Identificação molecular das leveduras por reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR) .....	41
4.2.2.6	Sequenciamento do DNA.....	42
4.2.3	Análise Sensorial .....	42
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
5.1	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	50
5.2	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	69
5.3	ANÁLISE SENSORIAL .....	72
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>80</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Mel é o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000). Sua composição depende, basicamente, da composição do néctar, da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz (ANACLETO et al., 2009).

Na história da humanidade, o mel foi uma das primeiras fontes de açúcar para o homem, o que é evidenciado pelo uso do mel e pólen das abelhas nativas sem ferrão nos períodos pré-hispânicos e o papel que desempenharam na dieta das comunidades indígenas americanas (ALVES et al., 2005). Para a criação de abelhas existem duas grandes práticas: a Apicultura e a Meliponicultura. A apicultura visa criação de abelhas *Apis mellifera* e a meliponicultura, a de abelhas indígenas sem ferrão (meliponíneos), ambas tem como principal produto, o mel (NOGUEIRA-NETO, 1997). Embora a produção de mel seja menor, os meliponíneos fornecem um produto distinto do mel de *Apis mellifera*, pela doçura e aroma inigualáveis, possuindo consumidores dispostos a pagar altos preços pelo produto no mercado (CARVALHO et al., 2005).

Em termos de composição, a principal diferença entre o mel de meliponíneos e o de *Apis* é o maior teor de água, que o torna menos denso e mais susceptível à degradação. A cor também varia do transparente ao âmbar escuro, e a espécie, época, região e florada influenciam o gosto e níveis de açúcar (OLIVEIRA et al., 2012).

O mel das abelhas sem ferrão é muito procurado pelos consumidores, principalmente pelos efeitos terapêuticos que lhes são atribuídos. Contudo, os meliponicultores têm demonstrado preocupação com a conservação da qualidade desse produto, em função do seu elevado teor de umidade, o que favorece o processo de fermentação e promove a sua deterioração (SODRÉ et al., 2008). Diversas técnicas podem ser empregadas para conservação do mel, dentre as quais a desumidificação, a pasteurização e a refrigeração, que objetivam manter durante o maior espaço de tempo possível suas qualidades sanitárias, sensoriais e nutricionais (SILVA, 2000), porém estas técnicas normalmente causam alterações irreversíveis nas características naturais do mel, como conteúdo de açúcares e enzimas.

De acordo com Freitas et al. (2010), o aumento do tempo (4, 8, 16 e 24 horas) de tratamento térmico a 70 °C em estufa provoca redução da acidez e conseqüente aumento de pH, redução da umidade e aumento da concentração de açúcares redutores e hidroximetilfurfural em mel de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*).

O processo de maturação em alimentos envolve reações bioquímicas e alterações pela ação de microrganismos. No mel ela modifica as características sensoriais da matéria-prima e é utilizada para conservação, pois impede o desenvolvimento de

microrganismos patógenos e deteriorantes (PEREDA et al., 2005), porém ainda não foram publicados estudos que descrevam detalhadamente este processo, mas possivelmente ocorre uma fermentação e ações das enzimas oriundas das abelhas. Sendo assim, o objetivo da pesquisa foi estudar os efeitos do congelamento, pasteurização e maturação espontânea do mel de abelhas nativas sobre suas características físico-químicas e sensoriais, visando sua conservação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o impacto dos métodos de conservação, congelamento, pasteurização e maturação espontânea sobre as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do mel de tiúba.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o mel de tiúba quanto as suas características físico-químicas e microbiológicas.
- Submeter o mel de tiúba aos processos de congelamento, pasteurização e maturação em duas condições (20 e 30 °C).
- Acompanhar as alterações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do mel durante o processo de maturação.
- Identificar os microrganismos responsáveis pela maturação.
- Definir o perfil sensorial por meio da Análise Descritiva Quantitativa de méis maturado, congelado e pasteurizado.
- Avaliar a aceitação sensorial do mel maturado, congelado e pasteurizado.
- Estimar as condições de maturação do mel (tempo e temperatura) que resultem em melhores características físico-químicas e sensoriais.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO E USO DO MEL

##### 3.1.1 Mundial

Desde a Idade Média o mel já era conhecido e utilizado como remédio e adoçante. Acreditava-se que ele era responsável, junto com o azeite, pela longevidade dos romanos, e sabe-se que as abelhas acompanham o homem desde a pré-história. Na Era da Pedra Lascada, os homens dedicavam-se à caça e à pesca, e nessas andanças pela sobrevivência, alimentavam-se de favos de mel que encontravam no mato. Para facilitar a busca por este precioso alimento dourado, eles foram levando os ocos das árvores com favo de mel para mais perto de sua caverna, e com o passar do tempo verificaram que após a retirada do mel, se fechassem o ninho novamente, as abelhas reconstruíam a parte saqueada. Desta forma nasceram as primeiras raízes da apicultura primitiva (SCHIRMER, 1986). O mel não era só considerado alimento de primeira linha, como também elemento do mais alto valor terapêutico para todas as doenças. No Egito antigo, era o medicamento mais popular, participando de 500 dos 900 remédios da época (MENDES et al., 2009). Na Grécia antiga, o valor do mel foi aclamado e apreciado, usado muitas vezes como uma oferenda para os deuses, além disso, Hipócrates e Dioscorides enfatizaram seu valor nutricional e farmacológico (KARABAGIASA et al., 2014).

À medida que o homem progrediu em sua evolução cultural também melhorou o alojamento das abelhas. Construíram alojamentos econômicos e térmicos, feitos de palha de trigo, atado em feixes e torcido numa espessura de punho e enrolado em forma de balde, emborcado em cima de uma prancha de madeira. Este é atravessado por espetos de bambu, para que as abelhas construam o favo em meio deles, dando uma maior firmeza. Na colheita, era só virá-lo. Para dar um aspecto mais liso, revestia-se com uma massa de esterco de vaca, pintada com verniz. A este alojamento deu-se o nome de “LÜNEBURGER-STÜLBER” (Figura 1) (WIESE, 2005).

**Figura 1** – Alojamento “LÜNEBURGER-STÜLBER” para abelhas.



**FONTE:** WIESE (2005)

### 3.1.2 No Brasil

Os primeiros criadores de abelhas que se tem notícia no Brasil foram os jesuítas, que trouxeram do continente europeu pelos imigrantes que vieram para o Brasil trazendo consigo alguns enxames. Em 1839, o Padre Antônio Carneiro conseguiu, com a autorização de Dom Pedro II, importar para o Estado do Rio de Janeiro algumas famílias do reino *Apis Mellifera Mellifera*. Em 1879, no Rio Grande do Sul, o imigrante Frederico Augusto Hanemann importou da Alemanha algumas abelhas da família *Apis Mellifera Ligustica*. Ainda no sul do Brasil, o desenvolvimento da criação de abelhas foi promovido pelo fato de o professor Emilio Schenck ter divulgado esta técnica como uma atividade extensionista (WIESE, 2005).

As primeiras técnicas extrativistas e predatórias causavam danos ao meio ambiente e ainda matava as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, instalá-los em colmeias racionais e manejá-los de forma que houvesse maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Nascia, assim, a apicultura, na qual, além do mel, é possível explorar, com a criação racional das abelhas, produtos como pólen apícola, geleia real, rainhas, polinização e cera (PEREIRA et al., 2003).

Dados do IBGE (2012) apontam o Brasil em 9º lugar no ranking da produção de mel, com 38.764 toneladas anuais (Quadro 1).

**Quadro 1** – Maiores produtores de mel no mundo.

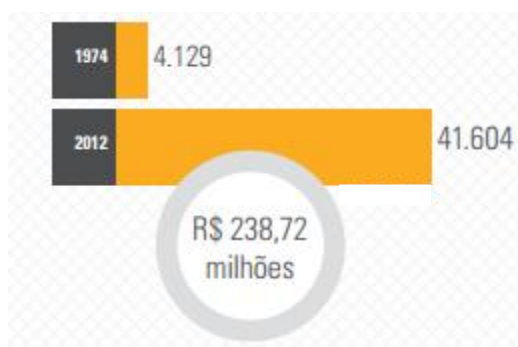
Posição	País	Produção (tonelada)
1º	China	367.219
2º	Turquia	82.003
3º	Argentina	81.000
4º	Ucrânia	74.000

5º	Estados Unidos	65.366
6º	Índia	65.000
7º	Rússia	53.598
8º	Etiópia	42.000
9º	Brasil	38.764
10º	Canadá	29.387

**FONTE:** IBGE (2012)

Ao se pensar nos sistemas apícolas no Brasil, é possível avaliar quanto essa atividade vem crescendo, considerando os últimos 40 anos de produção, em que o setor progrediu mais de 10 vezes (Figura 2) (SEBRAE, 2014).

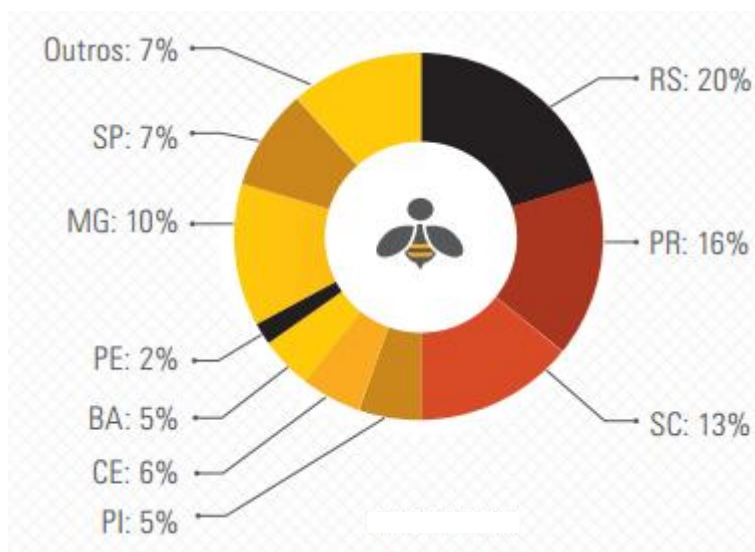
**Figura 2 – Atividade apícola nos últimos 30 anos.**



**FONTE:** SEBRAE (2014)

Com relação aos estados produtores é possível observar que o somatório dos estados da região Sul representa 49% da produção de mel do país e o somatório dos principais estados do Nordeste e Sudeste, representam 18% e 17% respectivamente, o que demonstra que estes 9 estados são responsáveis por 84% da produção do mel nacional (Figura 3) (SEBRAE, 2014).

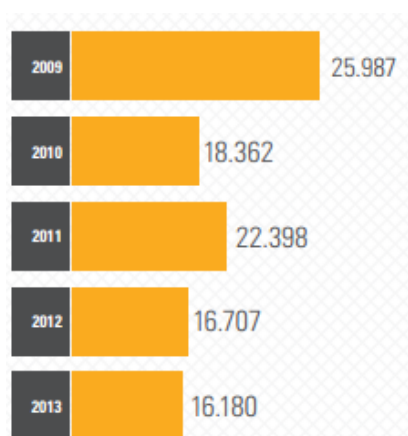
**Figura 3** - Participação dos principais estados na produção do mel brasileiro (%).



**FONTE:** SEBRAE (2014)

Com relação à exportação, os valores caíram 38% entre 2009 e 2013 por causa de perdas de enxames nas regiões produtoras. Estas perdas foram provenientes de secas, que fez com que o nordeste brasileiro, que desde 2009 ocupava o posto de maior região exportadora, reduzisse 52% da produção e 25% das exportações, dando lugar de principal exportação à região sul (Figura 4) (SEBRAE, 2014).

**Figura 4** – Exportação do mel brasileiro entre 2009 e 2013 (toneladas).



**FONTE:** SEBRAE (2014)

No Brasil, a criação de abelhas é dividida em duas práticas distintas, a Apicultura e a Meliponicultura. A apicultura caracteriza-se pelo manejo de abelhas da espécie *Apis mellifera* com o objetivo de produzir mel. E entende-se por meliponicultura a prática de manejar

abelhas indígenas sem ferrão, sendo a obtenção do mel um dos objetivos dessa atividade (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os insetos constituem um grande Filo zoológico, dividido em várias Ordens, e uma delas é a dos Himenópteros, que compreende as formigas, vespas e abelhas. As abelhas podem ser reunidas na superfamília Apoidea, dividida em diversas famílias. A que tem hábitos mais sociais é a família Apidae, que possui 4 subfamílias: Apíneos, Melopíneos, Bombíneos e Euglossíneos. Entre os Apíneos, a única espécie que vive no Brasil é a *Apis mellifera* e os Melopíneos são as abelhas indígenas sem ferrão, popularmente conhecidas como Jataí, Mirim da Terra, Uruçu, Mandaçaia entre outras (NOGUEIRA-NETO, 1997). De maneira geral, o mel produzido pelas espécies de meliponíneos apresenta diferenças em alguns parâmetros físico-químicos quando comparados ao mel produzido por *A. mellifera*, principalmente com relação à sua umidade, que é bastante elevada, tornando-o menos denso que o mel das abelhas africanizadas (*Apis mellifera*) (ALVES et al., 2011). Por isso este tipo de mel precisa de um beneficiamento posterior a sua colheita para poder ser comercializado.

### 3.2 ABELHAS MELIPONÍNEAS

Situando os meliponíneos dentro dos arthropoda podemos dizer que pertencem à classe insecta, sub-classe pterigogênea, ordem hymenoptera, sub-ordem clistogastra, superfamília apoidea, família apidae, sub-família apinae, tribo meliponini e gêneros melípona, trigona e lestrimelitta (KERR et al., 1996). O gênero melipona apresenta distribuição geográfica exclusivamente neotropical, abrangendo da América do Sul até a América Central e México (CAMARGO, 1994), e no Brasil se distribui geograficamente desde o Maranhão até o Pará. A abelha tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) (Figura 5) foi domesticada pelos índios do Maranhão e tem um desenvolvimento muito superior às *compressipes* de outros estados e países, seu ciclo de desenvolvimento completa-se em aproximadamente 45 dias para a operária e 40 dias para a rainha (KERR et al., 1996).

**Figura 5** – Abelha Tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*).



**FONTE:** MENEZES (2015)

### 3.3 PRODUÇÃO

Basicamente o mel é formado pela ação de enzimas invertase, diastase e glicose-oxidase das abelhas sob o néctar, o qual após ser reduzido é depositado nos alvéolos, onde ocorrem as transformações físicas, principalmente cristalização e desidratação (WIESE, 2005). Segundo Crane (1983), a adição de enzimas pelas abelhas ao néctar irá causar mudanças químicas, que irão aumentar a quantidade de açúcar. A enzima invertase adicionada pelas abelhas transforma 3/4 da sacarose inicial do néctar coletado nos açúcares invertidos glicose e frutose. Sua ação é contínua até que o amadurecimento total do mel ocorra. A diastase quebra o amido, e a glicose-oxidase reage com a glicose formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, esse último capaz de proteger o mel contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo.

Wiese (2005) cita que as plantas, através de suas flores, oferecem às abelhas o precioso néctar, cuja aparência é a de um líquido doce, com grande volume de água (cerca de 50%). Esse líquido se acumula em maior ou menor quantidade, no nectário das flores, onde as abelhas o retiram e transportam em sua vesícula melífera até a colmeia, depositando-o nos favos, já transformado em mel. Os favos serão posteriormente operculados (fechados com uma fina camada de cera). Até no depósito que se faz nos favos a abelha garante a qualidade do mel, daí em diante a responsabilidade fica a cargo do apicultor. Ele deve retirar os favos de mel cuidando para não comprometer a qualidade do produto. Por fim o mel é extraído e devidamente processado.

### 3.4 CLASSIFICAÇÃO

Conforme a legislação brasileira, os méis são classificados de acordo com a origem, processo de obtenção e forma de apresentação (BRASIL, 2000). Quanto à origem tem-se:

(a) mel floral: mel obtido dos néctares das flores. Pode ser unifloral/monofloral quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, ou multifloral/polifloral, quando é obtido a partir de diferentes origens florais;

(b) melato ou mel de melato: mel obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas.

Quanto ao processo de obtenção o mel é classificado em:

(a) mel escorrido: mel obtido por escorrimento dos favos desoperculados, sem larvas;

(b) mel prensado: mel obtido por prensagem dos favos, sem larvas;

(c) mel centrifugado: mel obtido por centrifugação dos favos desoperculados, sem larvas.

Quanto à forma de apresentação ou processamento:

(a) mel: mel em estado líquido, cristalizado ou parcialmente cristalizado;

(b) mel em favos ou mel em secções: mel armazenado pelas abelhas em células operculadas de favos novos, construídos por elas mesmas, que não contenham larvas e comercializado em favos inteiros ou em secções de tais favos;

(c) mel com pedaços de favo: mel que contém um ou mais pedaços de favo com mel, isentos de larvas;

(d) mel cristalizado ou granulado: mel que sofreu um processo natural de solidificação, como consequência da cristalização dos açúcares;

(e) mel cremoso: mel que tem uma estrutura cristalina fina e que pode ter sido submetido a um processo físico, que lhe confira essa estrutura e que o torne fácil de untar;

(f) mel filtrado: mel que foi submetido a um processo de filtração, sem alterar o seu valor nutritivo.

### 3.5 COMPOSIÇÃO

O mel é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração, não podendo ser adicionado de açúcares e/ou outras substâncias que alterem a sua composição original (BRASIL, 2000).

Sua composição depende das fontes vegetais das quais ele é derivado, solo, espécie da abelha, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas da colheita entre outros (ALVES et al., 2005), porém a legislação brasileira, que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização, só atende às características do mel de *A. mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país (meliponíneos).

A Tabela 1 apresenta a diferença na composição dos méis de *Apis mellifera* e de duas abelhas nativas, *Tetragonisca angustula latreille* e *Melipona fasciculata* publicada por Welke et al. (2008), Anacleto et al. (2009) e Holanda et al. (2012), respectivamente.

**Tabela 1** – Caracterização físico-química de méis de diferentes abelhas no Brasil.

	<i>Apis mellifera</i> <sup>1</sup>	<i>Tetragonisca angustula latreille</i> <sup>2</sup>	<i>Melipona fasciculata</i> <sup>3</sup>
<b>Umidade (g/100g)</b>	16,20	24,37	21,85
<b>Sacarose Aparente (g/100g)</b>	-	0,95	2,46
<b>Acidez Total (meq/kg)</b>	30,10	45,23	33,49
<b>pH</b>	4,00	4,10	3,50
<b>Açúcar Redutor (g/100g)</b>	67,80	55,46	60,14

<sup>1</sup>*Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup>*Tetragonisca angustula latreille* do município de Piracicaba no Estado de São Paulo

<sup>3</sup>*Melipona fasciculata* Smith da região do cerrado maranhense

### 3.5.1 Umidade

Para estar em conformidade com a legislação brasileira o mel deve apresentar umidade máxima de 20 g/100 g (BRASIL, 2000), mas no caso de méis de abelhas nativas este valor não é atendido. Alves et al. (2005) analisaram umidade de mel de *Melipona mandacaia* provenientes de comunidades rurais da região semi-árida do Estado da Bahia e encontraram valores de 23,14 a 32,50 g/100 g. Os autores atribuem o excesso de água encontrado no mel dos meliponíneos à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processo de transformação em mel. Stramm (2011) encontrou média de 24,80 g/100g para méis de *Melipona subnitida*. Vários outros autores (ALMEIDA-MURADIAN; MATSUDA, 2007; CAVALCANTE, 2006; VILLAS-BÔAS; MALLASPINA, 2005) apresentam dados confirmando que a umidade de méis de abelha sem ferrão é maior que a de *Apis mellifera*, além de superar o limite estabelecido pela legislação brasileira para méis de *Apis* (BRASIL, 2000).

### 3.5.2 Açúcares

Os açúcares juntamente com a água são os principais componentes do mel, onde os monossacarídeos frutose e glicose representam 35,7 e 29,7%, respectivamente e os dissacarídeos sacarose e maltose apenas 0,4 e 1,6%, respectivamente da quantidade total (MENDES et al., 2009). A glicose, por ter pouca solubilidade, determina a tendência da cristalização do mel (CARVALHO et al., 2005), e a frutose, por resultar em interação adequada entre os grupos ativos da molécula e receptor do gosto nas papilas gustativas, possibilita a sua doçura intensa (RYBAK-CHMIELEWSKA, 2004). De acordo com Venir et al. (2010), alguns índices do conteúdo de açúcares são geralmente associados com a tendência de cristalização no mel. Entre esses, a razão entre frutose(F)/glicose(G) de 1,14 ou menos, indica rápida

tendência de cristalização, enquanto valores maiores que 1,58 estão associados à baixa tendência de cristalização.

Alves et al. (2011) avaliaram o teor de açúcares redutores de três amostras de méis de abelhas nativas oriundos de três regiões distintas (Exu-PE, Apodi-RN e Picos-PI) e encontraram valores de 51,23 g/100 g para o mel da espécie Uruçu, 61,17 g/100 g no da espécie Jandaíra e 50,13 g/100 g no da espécie Tiúba. Esses valores são inferiores ao valor mínimo de açúcares redutores (65 g/100 g) estabelecido pela norma brasileira vigente para méis de *A. mellifera* (BRASIL, 2000).

### 3.5.2.1 Sacarose Aparente

Caracterizando méis de *Tetragonisca angustula*, um meliponíneo, produzidos na região de Piracicaba, Anacleto et al. (2009) encontraram valores de sacarose aparente que variaram entre 0,13 a 1,87 g/100 g. A concentração de sacarose constitui um bom critério para diferenciar os méis monoflorais dos poliflorais. O teor elevado deste açúcar significa, na maioria das vezes, que houve uma colheita prematura do mel, isto é, a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase (ALVES et al., 2005). Lira et al. (2014) encontraram média de 6,33 e 3,96 g/100g para méis de *Scaptotrigona sp.* e *Tetragonisca angustula*, respectivamente.

### 3.5.3 Sólidos Insolúveis

Os sólidos insolúveis correspondem aos resíduos de cera, asas e patas das abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou do processamento que este sofreu. Pode ser um indicativo de controle higiênico, pois permite detectar as impurezas presentes no mel (MENDES et al., 2009). O limite máximo é 0,1 g/100 g, exceto no mel prensado, sendo permitido até 0,5 g/100 g (BRASIL, 2000). Em méis de *Melipona subnitida*, Stramm (2011) não detectou a presença de sólidos insolúveis.

### 3.5.4 Cinzas

O teor de cinzas expressa os minerais presentes no mel, o qual é utilizado na verificação da qualidade do produto. Os sais minerais podem ser modificados por fatores relativos às abelhas, ao apicultor, clima, solo ou origem botânica (CARVALHO et al., 2005). O valor para porcentagem de cinzas exigido pela legislação (máximo de 0,6 g/100 g) (BRASIL, 2000) coincide com os valores encontrados por Anacleto et al. (2009) em méis de *Tetragonisca*

*angustula*, que variaram entre 0,21 a 0,60 g/100 g. Vit et al. (1998) também publicaram valores coerentes com a legislação para *Apis mellifera*, 0,38 g/100g em méis de *T. angustula*.

### 3.5.5 Acidez

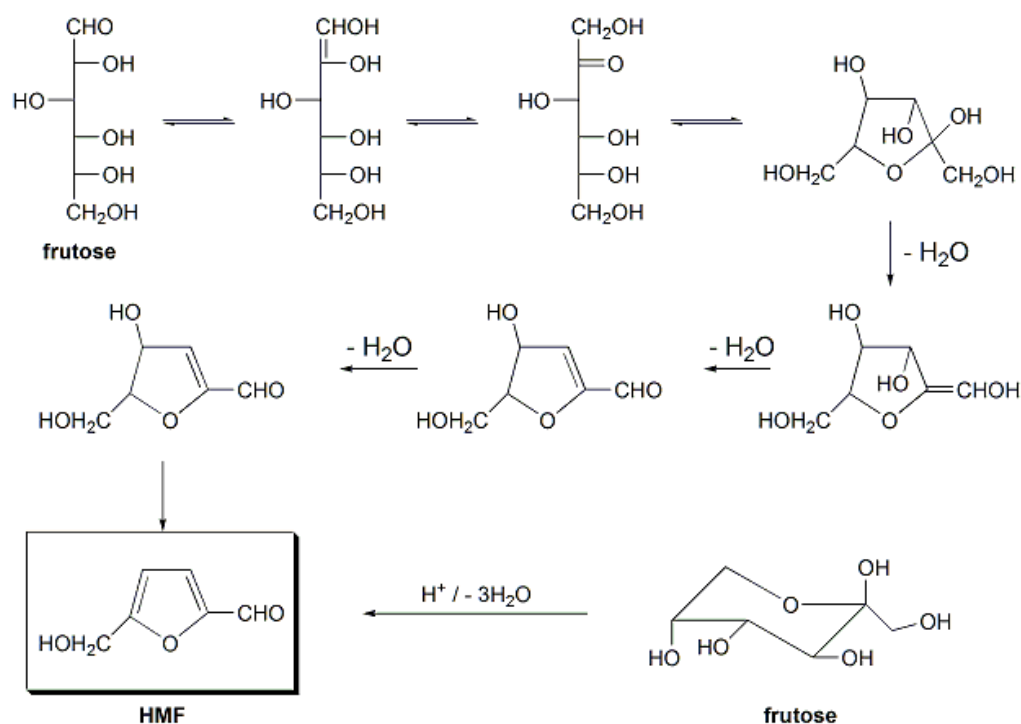
A acidez do mel tem sua origem na variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctares, pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, pela ação de diferentes bactérias durante a maturação e pelas quantidades de minerais presentes (CARVALHO et al., 2005). Os valores da acidez para as amostras analisadas por Alves et al. (2005) para méis de *Melipona mandacaia* variaram entre 18,50 e 62,50 meq.kg<sup>-1</sup>, com média de 43,48 meq.kg<sup>-1</sup>. Para méis de *Scaptotrigona sp.* e *Tetragonisca angustula* os valores médios de acidez são de 81,01 e 71,68 meq.kg<sup>-1</sup>, respectivamente (LIRA et al., 2014). Para méis de *Melipona subnitida* o valor médio encontrado por Stramm (2011) é de 22,49 meq.kg<sup>-1</sup>.

O valor de pH do mel não é um parâmetro de controle de qualidade proposto pela legislação brasileira, mas ele refere-se aos íons hidrogênio presentes e que podem influenciar na formação de outros componentes, como na velocidade de produção do hidroximetilfurfural. Os méis de *Apis* tem o valor de pH variando de 3,20 a 4,60, similares aos de abelhas sem ferrão variam de 3,20 a 4,80 (CARVALHO et al., 2005).

### 3.5.6 Hidroximetilfurfural (HMF)

O hidroximetilfurfural, comumente chamado de HMF, é um dos constituintes secundários do mel mais discutido. É formado durante a reação de Maillard ou caramelização, sendo a rota da desidratação de hexoses, principalmente frutose, em meio ácido a rota mais bem estabelecida para sua produção. O mecanismo de desidratação de hexoses ainda não foi bem elucidado na literatura, mas em geral, os caminhos da reação para a produção de HMF incluem isomerização, desidratação, fragmentação, reversão e condensação (TONG; YANG, 2010), ilustrados na Figura 6. Sua presença é um indicador de qualidade do mel, quando presente em níveis elevados indica uma queda no valor nutritivo do mel pela destruição, por meio de aquecimento, de algumas vitaminas e enzimas que são termolábeis (CARVALHO et al., 2005). A legislação vigente (BRASIL, 2000) estabelece o máximo de 60 mg/kg para méis de *Apis mellifera*. Em méis de *M. asilvai* e *M. subnitida*, Souza et al. (2004) e Stramm (2011) encontraram valores médios de 2,4 e 7,56 mg/kg, respectivamente.

**Figura 6** – Provável mecanismo de formação do hidroximetilfurfural.



**FONTE:** GOMES, 2009

### 3.6 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

O crescente interesse no mel produzido por abelhas sem ferrão é devido aos seus componentes que tem sido associados às propriedades antissépticas, antimicrobianas, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias entre outras (SILVA et al., 2013). As inúmeras características do mel contribuem para a atividade antimicrobiana, dentre os principais fatores estão a ação catalítica das enzimas glicose-oxidase, que é responsável pela conversão da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio que atacam o envoltório dos microrganismos, a baixa atividade de água, o baixo potencial redox devido ao alto teor de açúcares redutores, a viscosidade e o baixo pH. O mel também favorece o crescimento, atividade e viabilidade de cepas de bifidobactérias melhorando as funções da microbiota intestinal, sendo assim, também tem propriedades prebióticas (SILVA et al., 2006).

Os compostos fenólicos presentes no mel também o caracterizam como um excelente antioxidante. Oliveira et al. (2012) realizaram estudo da atividade antioxidante nos méis de três diferentes espécies de abelhas nativas e verificaram que os melhores resultados são para méis que apresentam os teores mais elevados de polifenóis totais e coloração mais escura, sendo os compostos majoritários o ácido gálico e a quercetina.

### 3.7 CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

O controle de qualidade do mel por meio da análise sensorial é realizado considerando as características de aparência (cor), aroma, consistência e sabor. Sua avaliação sensorial nos permite distinguir a origem botânica do mesmo e identificar e quantificar certos defeitos (fermentação, impurezas, odores e sabores diferentes), sendo a análise descritiva a mais sofisticada das metodologias disponíveis para o profissional sensorial quando comparado com os métodos de discriminação e aceitação (MANTILLA et al., 2012). Aroma e sabor estão relacionados diretamente com a cor do mel, geralmente quanto mais escuro o mel, mais forte seu aroma e seu sabor, e estes dependem quase que exclusivamente da origem floral. Porém, o envelhecimento, armazenamento e temperatura, são fatores que podem afetar essas características (ALVES et al., 2005).

#### 3.7.1 Cor

A cor do mel pode ser avaliada tanto por análise sensorial, empregando julgadores, como por meio de instrumentos, colorímetros ou espectrofotômetros. As cores variam em três dimensões: tonalidade cromática (*hue*), que é o atributo que identifica as cores, luminosidade ou brilho (*brightness*), que descreve a relação entre a luz refletida ou absorvida e croma, saturação ou pureza (*chroma*), que indica a pureza da cor, quando esta é diferente do cinza (ABNT, 1992).

No sistema CIELAB (Figura 7), a cor é descrita por um diagrama tridimensional, onde o espaço é definido pelas coordenadas retangulares ( $L^*, a^*, b^*$ ).  $L^*$  (luminosidade), varia de 0 (preto) a 100 (branco),  $a^*$  define o componente vermelho(+ $a^*$ )-verde(- $a^*$ ) e  $b^*$  define o componente amarelo(+ $b^*$ )-azul(- $b^*$ ). Os parâmetros croma e tonalidade cromática são coordenadas cilíndricas do mesmo espaço. O  $H^*$  (tonalidade cromática) mostra a localização da cor em um diagrama, onde o ângulo  $0^\circ$  representa vermelho puro, o  $90^\circ$ , o amarelo puro,  $180^\circ$ , o verde puro e  $270^\circ$ , o azul puro. O croma ( $C^*$ ) é definido pela distância de  $H^*$  ao centro do diagrama tridimensional, sendo o zero no centro e aumentado de acordo com a distância (LAWLESS; HEYMANN, 1998).

**Figura 7** – Esquema de cromaticidade do sistema CIELAB.



**FONTE:** AMARAL et al. (2012)

No mercado em geral existe uma tendência da valorização dos méis mais claros em relação aos mais escuros, mesmo que em relação aos alimentos, o sabor e aroma sejam mais importantes. Os méis tornam-se mais escuros durante sua estocagem e o seu escurecimento é fortemente acelerado pela ação de altas temperaturas, em aquecimento direto ou pelas condições de estocagem, em virtude do aumento da concentração de hidroximetilfurfural. O padrão comercial de classificação da cor do mel é a escala de *Pfund*, elaborada pela Companhia Manufatora Koehler (CRANE, 1983), cujas medidas são feitas a partir de leituras de absorvância a 560 nm em espectrofotômetro e transformadas em milímetros, variando de branco d'água (1 a 8 mm) a âmbar escuro (> 114 mm).

### 3.7.2 Aroma e Sabor

O sabor do mel está fortemente atrelado ao seu aroma e ambas características dependem de quantidades diminutas de substâncias complexas derivadas das fontes florais, como álcoois, aldeídos, ácidos e estéreis. Sendo assim, diferentes méis com sabores e aromas específicos podem ser caracterizados e identificados pelas diferentes fontes florais, dando pistas sobre quais plantas forneceram o néctar para a sua composição (CRANE, 1983).

### 3.8 BENEFICIAMENTO PARA CONSERVAÇÃO

O mel de meliponíneos apresenta maior teor de água (umidade de 25,25%) quando comparado com o mel de abelha *Apis* (18,76%), dificultando o seu armazenamento, pois o alto teor de água do produto diminui a sua vida de prateleira (ALVES et al., 2011). Os métodos para beneficiamento são utilizados para transformar o mel *in natura*, com grande potencial de fermentação, em um produto estável, que mantenha suas características físicas, químicas e sensoriais o maior tempo possível na prateleira do mercado ou na casa do consumidor (VILLAS-BÔAS, 2012).

#### 3.8.1 Refrigeração

Na indústria de alimentos, a refrigeração é um método consagrado para retardar o processo de degradação dos produtos. Isso acontece porque as baixas temperaturas dificultam o desenvolvimento dos microrganismos. No caso do mel de abelhas sem ferrão, a refrigeração é um método muito eficiente, já que diminui a proliferação de leveduras e bactérias e retarda a fermentação, porém é também dispendioso, pois o produtor deve refrigerar o mel logo após a colheita, transportá-lo refrigerado e comercializá-lo em prateleiras refrigeradas ou geladeiras (SODRÉ et al., 2008).

#### 3.8.2 Desumidificação

Para realizar a desumidificação do mel, existem dois equipamentos principais disponíveis no mercado: a) máquina de desumidificação: desidratação a frio, o que não danifica a composição natural dos nutrientes e vitaminas presentes no mel; b) sala de desumidificação: sala equipada com um desumidificador de ar e um ar condicionado, onde a água do mel evapora para o ar seco gerado pelo desumidificador, enquanto o ar condicionado colabora retirando o vapor da sala para o ambiente externo. A vantagem do segundo sistema é o menor custo. A desvantagem de ambos é a alteração nas características sensoriais naturais do mel de abelhas sem ferrão, tido por muitos como mais saboroso por ser menos viscoso e doce (VILLAS-BÔAS, 2012).

#### 3.8.3 Pasteurização

A pasteurização é um procedimento usado em alimentos para destruir microrganismos patogênicos ali existentes. Consiste basicamente no aquecimento do alimento a determinada temperatura, por determinado tempo, de forma a reduzir a carga microbiana. No

caso do mel, essa temperatura não deve exceder 65°C, condição em que alguns açúcares nele presentes começam a degradar, alterando seu sabor e comprometendo suas características naturais. O mel não pode ser pasteurizado diretamente no fogo, então sugere-se que seja pasteurizado no próprio recipiente onde será guardado ou comercializado, o que otimiza sua hermetização e diminui as possibilidades de contaminação depois do procedimento. Para tanto, os recipientes devem ser, obrigatoriamente, de vidro. O aquecimento deve se realizado num banho-maria e com os recipientes abertos, o que permite a saída do ar que eventualmente está contido no mel. Após 30 minutos a 65°C, deve ser retirado do banho-maria, fechado e resfriado em água corrente. O resfriamento rápido acelera a hermetização do recipiente. Dependendo da espécie de abelha e do teor de umidade do mel *in natura*, a pasteurização tem proporcionado um tempo de validade que varia entre 6 meses e 1 ano (VILLAS-BÔAS, 2012). Sodré et al. (2008) pasteurizaram amostras de mel de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* a 70°C por um minuto e avaliaram perfil sensorial e aceitabilidade desses méis. Os autores verificaram que o tratamento utilizado não interferiu nos atributos cristalização, sabor e aceitabilidade, porém mesmo após pasteurizado, depois de aberto, o recipiente contendo mel é necessário conservá-lo sob refrigeração para evitar processos de deterioração físico-química e microbiológica.

#### 3.8.4 Maturação

A maturação é uma técnica que foi aprimorada pelo Projeto Abelhas Nativas (PAN), no estado do Maranhão, com base em um costume tradicional de povos indígenas da América Central, em especial dos Maias de consumir mel fermentado. Ainda não foram publicados estudos que descrevam detalhadamente o processo de maturação, mas sabe-se que após algum tempo de armazenamento, a fermentação do mel se estabiliza, e que o mel fermentado/maturado é mais ácido e com leves traços alcoólicos. As leveduras osmofílicas são o tipo de microrganismo mais provável responsável por esta reação, capazes de se desenvolver em ambientes de alta pressão osmótica e, principalmente, tolerar altas concentrações de açúcar. Porém a maioria dos estudos avalia apenas a qualidade microbiológica dos produtos e ainda não identificaram quais são os possíveis microrganismos responsáveis pela fermentação. A maturação consiste em armazenar os recipientes tampados de mel em ambiente escuro, dentro de uma caixa de isopor com temperatura controlada (aproximadamente 30°C) e a cada 5 dias abrir a tampa do recipiente para liberação do gás carbônico produzido na fermentação até a estabilização, que é observada quando o colarinho formado pela espuma se adere à garrafa (VILLAS-BÔAS, 2012).

A fermentação dos alimentos é uma prática muito antiga e consiste basicamente na modificação intencional dos alimentos pela atividade de certos microrganismos para obter produtos de sabor agradável, saudáveis e estáveis. Antes de se conhecer seu fundamento

científico, a fermentação era usada para conservar alguns alimentos sazonais ou perecíveis graças aos produtos finais formados (ácidos ou alcoóis), que impedem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes, conseqüentemente também produzem substâncias bactericidas, diminuem o potencial redox e atividade de água. A fermentação modifica as características sensoriais da matéria-prima, de forma geral diminui a doçura e aumenta a acidez. Quanto às propriedades nutritivas, as condições suaves de processamento permitem reter a maior parte dos nutrientes presentes originalmente ou ainda aumentar o valor nutritivo, pois a hidrólise de carboidratos de alto peso molecular melhora sua digestibilidade. Além disso, alguns microrganismos sintetizam e podem liberar vitaminas complexas e outros fatores de crescimento no meio, contribuindo para a liberação dos nutrientes retidos em estruturas celulares ou para eliminação de substâncias antinutricionais e tóxicas (PEREDA et al., 2005).

Vasquez et al. (2008) estudaram as mudanças no mel citrus armazenado por 12 meses em diferentes temperaturas (10, 20 e 40°C) quanto aos parâmetros físico-químicos, conteúdo de açúcares e propriedades sensoriais. Os autores observaram reduções significativas nos compostos voláteis e açúcares em todas as temperaturas estudadas e aparecimento de atributos como queimado, vegetal cozido e fruto maduro no armazenamento a 40°C. Yanniotis et al. (2006) determinaram viscosidade de 421 a 23405 cP em méis de abelha sem ferrão com umidade que variava de 17 a 21% (g/100g). Visquert et al. (2014) analisaram a influência de diferentes tempos e temperaturas de armazenamento que o mel pode sofrer desde a colheita até o processo industrial, e verificaram que quanto maior tempo e temperaturas, maior a probabilidade de desenvolvimento de hidroximetilfurfural.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Para a pesquisa, o mel de Tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) colhido no estado do Maranhão, foi obtido junto aos produtores de abelhas nativas da Associação Indígena Tupinikim da Aldeia Pau Brasil – Aitupiapabra (Localização em UTM: 381757X, 7804390Y). O mel recém-colhido acondicionado em caixa isolada termicamente (isopor), foi remetido com 48 horas de transporte para a cidade de Londrina, estado do Paraná.

### 4.2 MÉTODOS

O experimento foi organizado conforme fluxograma apresentado na Figura 8. A amostra recém-colhida e recebida em Londrina foi acondicionada em recipientes herméticos de vidro de 180 mL, com tampa rosqueável. Os vidros foram distribuídos em diferentes condições de acordo com o tratamento que receberiam. A amostra congelada consistiu em colocar os recipientes em temperatura a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 180 dias. A amostra pasteurizada foi tratada em banho-maria (Tecnal – TE 120, USA), a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos, resfriada em água corrente e mantida a  $-18^{\circ}\text{C}$ , por 180 dias. As amostras foram maturadas em duas condições, na maturação 1, os vidros permaneceram em estufa sem circulação de ar na temperatura de  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , por 180 dias e na maturação 2, também permaneceram em estufa sem circulação de ar, porém com temperatura de  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias. Durante as maturações 1 e 2, a cada 7 dias todos os vidros eram abertos para liberação do gás carbônico e rapidamente fechados, e a cada 15 dias eram retiradas alíquotas para realizar as análises de monitoramento.

Para realizar as análises, as amostras que estavam congeladas eram deixadas à temperatura ambiente, sem agitação, por duas horas.

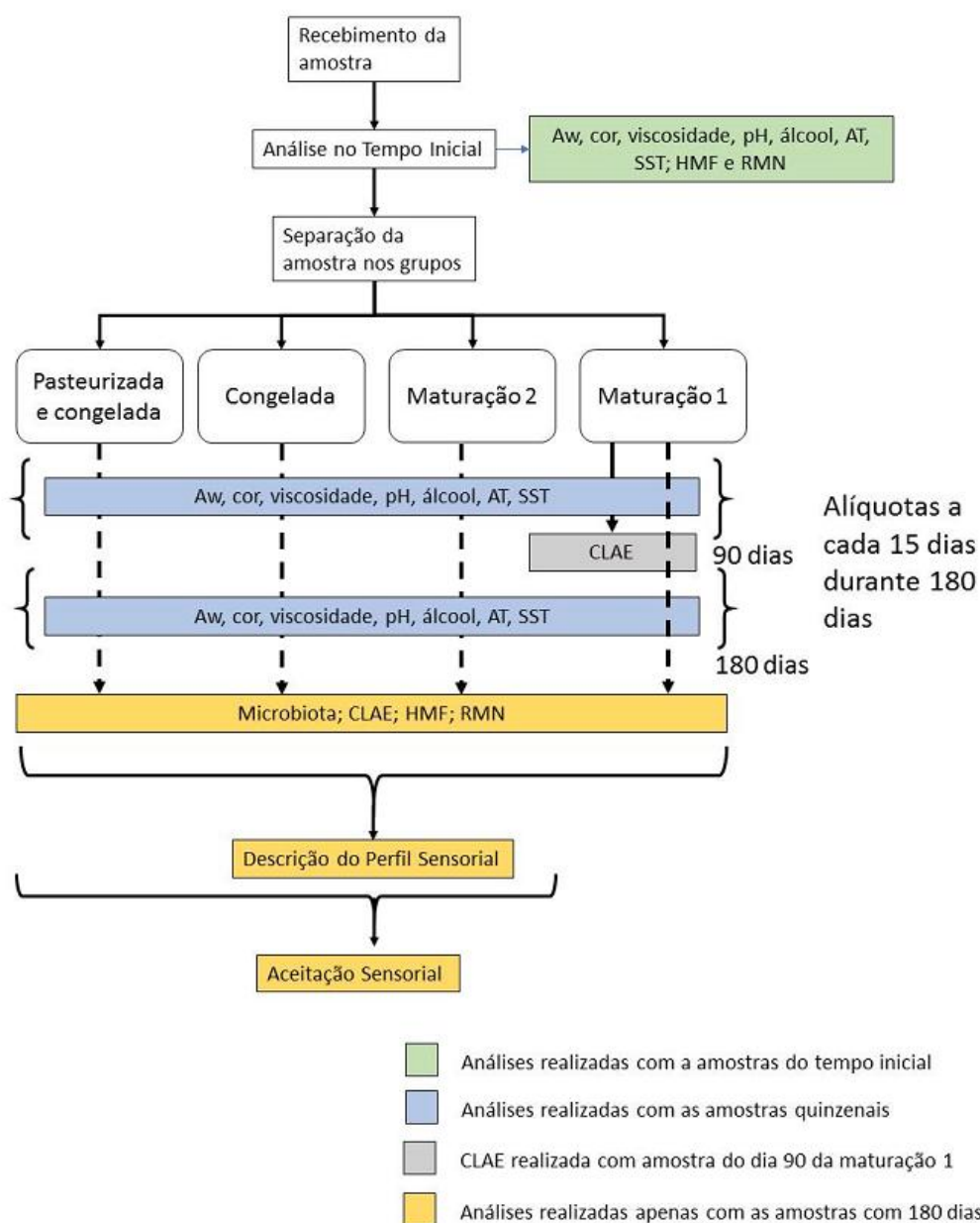
#### 4.2.1 Delineamento Experimental Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas foram conduzidas de acordo com delineamento inteiramente casualizado, em triplicata, para os cinco tratamentos (amostras tempo inicial, congelada por 180 dias, recém pasteurizada, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias e maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias).

Já as determinações executadas a cada 15 dias, durante o monitoramento das maturações também foram realizadas em triplicata, totalizando 22 tratamentos (combinações). A leitura da ressonância magnética nuclear foi realizada nos 27 tratamentos (5 tratamentos originais mais os 22 do monitoramento). A purificação, isolamento e sequenciamento da

microbiota foram realizadas em 6 tratamentos (amostra congelada por 180 dias, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 90 dias, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias, maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 90 dias e maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias) uma única vez. E a corrida cromatográfica foi realizada em triplicata nas amostras congelada por 180 dias, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 90 dias, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias, maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 90 dias e maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias.

**Figura 8 – Fluxograma da metodologia de trabalho.**



\*SST: sólidos solúveis totais;  $a_w$ : atividade de água; AR: açúcares redutores; AT: acidez total; HMF: hidroximetilfurfural; RMN: ressonância magnética nuclear; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 4.2.1.1 Açúcares Redutores

Os açúcares redutores foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson conforme metodologia adaptada da Embrapa (2013). A curva padrão de açúcares redutores foi feita em triplicata com as seguintes concentrações de glicose ( $\mu\text{g/L}$ ): 20, 40, 60, 80 e 100. Alíquota de 1 mL de amostra diluída em água destilada foi acrescida de 0,5 mL do reagente de Somogyi-Nelson I e mantida em banho-maria (Tecnal – TE 120, USA) em ebulição por 10 minutos. Retirou-se do banho, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Somogyi-Nelson II e aguardou-se 5 minutos para completa reação. Adicionaram-se 5 mL de água destilada e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Thermo – Genesys 6, USA) em comprimento de onda a 540 nm. A diluição utilizada para todas as amostras foi de 0,002 g/100 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em g/100 g.

#### 4.2.1.2 Álcool

A análise de álcool foi feita por adaptação do método por ebuliômetro, do Instituto Adolfo Lutz (2008), no qual 6 g de amostra foram diluídas em 45 mL de água destilada. A amostra diluída foi transferida diretamente para a caldeira do equipamento e a lamparina permaneceu acesa até que a temperatura se estabilizasse. A temperatura foi aferida com o termômetro acoplado ao equipamento e convertida em porcentagem de álcool (v/v) com o auxílio da régua de correção.

#### 4.2.1.3 Umidade

O teor de umidade no mel foi determinado pelo método de leitura em refratômetro (Metler Toledo - LiquiPhysics™ Excellence RM40, United Kingdom), a 20°C, obtendo-se a correspondente porcentagem de umidade através da relação entre o índice de refração a 20°C e o conteúdo de água em porcentagem (m/m), de acordo com a tabela de conversão anexada ao método de Chataway (AOAC 969.38) (2012).

#### 4.2.1.4 Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram expressos em °Brix, medido com refratômetro digital de bancada (Metler Toledo - LiquiPhysics™ Excellence RM40, United Kingdom) a 20°C.

#### 4.2.1.5 pH

Uma alíquota de 10 g de mel foi diluída em 75 mL de água destilada e o pH foi determinado em medidor digital de pH (Gehaka - PG2000, Brasil) (ADOLFO LUTZ, 2008).

#### 4.2.1.6 Acidez Total Titulável

A acidez total titulável, conforme método 962.19 da AOAC (2012) é a soma da acidez livre com acidez lactônica, estas obtidas por titulação com hidróxido de sódio 0,05 M e ácido clorídrico 0,05 M, respectivamente. Diluíram-se 10 g de amostra em 75 mL de água destilada, homogeneizou-se com auxílio de agitador magnético, e procedeu-se a leitura do pH. Titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,05 M até pH 8,5. Adicionaram-se 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05 M e procedeu-se a titulação com solução de ácido clorídrico 0,05 M até pH 8,3. O volume do branco foi aferido pela titulação de 75 mL de água com solução de hidróxido de sódio 0,05 M. O resultado foi expresso em meq/kg.

#### 4.2.1.7 Hidroximetilfurfural

A presença de hidroximetilfurfural foi verificada pela reação de Fiehe com resorcina, em meio ácido, conforme descrito no método 183/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Uma porção de 5 g de amostra foi pesada e extraída com éter etílico. A camada etílica foi transferida para um tubo de ensaio e adicionaram-se 5 gotas da solução clorídrica de resorcina a 1% (m/v). Após 5 minutos de reação, não havendo mudança de cor indica ausência e o aparecimento de coloração vermelha indica a presença de hidroximetilfurfural.

#### 4.2.1.8 Atividade de Água

A atividade de água foi quantificada em higrômetro (Aqualab - 4TEV, Brasil). Uma alíquota da amostra foi dispensada diretamente sob as cápsulas do equipamento e a leitura realizada a 25°C.

#### 4.2.1.9 Viscosidade

A viscosidade foi avaliada a 25°C em viscosímetro (Viscometer Brookfield® - modelo DV II+, USA), com *spindle* número 5 a 30 rpm.

## 4.2.1.10 Cor

A cor do mel durante o período de maturação foi classificada a partir da leitura de absorvância em comprimento de onda de 560 nm em espectrofotômetro, utilizando-se como branco a glicerina pura. O resultado foi expresso em absorvância e a cor denominada pela escala de *Pfund* (MARCHINI et al., 2004) (Quadro 2).

**Quadro 2** – Classificação de cor do mel de acordo com a escala de *Pfund*.

Cor	Escala de <i>Pfund</i> (mm)*	Faixa de cor**
Branco d'água	1 a 8	0,030 ou menos
Extra branco	8 a 17	0,031 a 0,060
Branco	17 a 34	0,061 a 0,120
Extra-âmbar claro	34 a 50	0,121 a 0,188
Âmbar claro	50 a 85	0,189 a 0,440
Âmbar	85 a 114	0,441 a 0,945
Âmbar escuro	Mais de 114	Mais de 0,945

\*milímetros; \*\*absorvância a 560nm em espectrofotômetro

FONTE: MARCHINI et al., 2004

Os parâmetros de cor no sistema Cielab L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul) foram determinados a 25°C, em colorímetro (Konica Minolta - Chroma Meter CR-4000, Japão) com iluminante D65 (luz natural do dia). Para leitura as amostras foram colocadas em cubetas com área de 16 cm<sup>2</sup> e ângulo de 45/0° de iluminação e 10° de observação. Os valores de tonalidade cromática (h°) e croma ou saturação (C\*) foram determinados pelas seguintes equações:

$$h^{\circ} = [\text{arc tang } (b^*/a^*)] \quad [\text{Equação 1}]$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad [\text{Equação 2}]$$

## 4.2.1.11 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para a análise de etanol, ácido láctico, glicose e sacarose por ressonância magnética nuclear 100 µL de amostra de mel foram solubilizadas em água e acrescida de 500 µL de DMSO-d<sub>6</sub> (Dimetilsulfóxido) com 5 µL de acetona 0,05% como calibrante. A determinação foi em aparelho de Ressonância Magnética Nuclear (Bruker - DRX 400, Alemanha), em 400 MHz para hidrogênio (1H-RMN), a 25°C.

#### 4.2.1.12 Análise de Ácidos Orgânicos e Carboidratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido Shimadzu (Shimadzu corp., Japão) acoplado com detector de índice de refração (RID-10A) e arranjo de fotodiodos (SPD-M20A). Empregou-se a coluna analítica Capcell Pak® Shiseido C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) para ácidos orgânicos, e para carboidratos a coluna Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm, 5 µm). O sistema de injeção (SIL-20AC HT) foi automático, com volume fixo de 20 µL para as amostras de ácidos orgânicos e 1 µL para as amostras de carboidratos, ambos com sistema de aquisição de dados através do *software* LC Solutions (Shimadzu corp., Japão). Para a quantificação de ácidos orgânicos a fase móvel empregada consistiu-se de solução tampão fosfato de sódio (25 mM), pH 2,4, a um fluxo constante de 1 mL/min, isocrático, à temperatura de 40°C, no comprimento de onda de 215 nm, com 25 minutos de corrida. Já para a separação dos carboidratos a fase móvel consistiu-se de água ultra pura, a um fluxo constante de 1 mL/min, isocrático, à temperatura de 80°C, no comprimento de onda de 215 nm, com 20 minutos de corrida (PAULI, CRISTIANO e NIXDORF, 2011).

A amostra de mel foi extraída em água destilada na proporção 1:1 (m/v) para a extração de ácidos orgânicos e 1:10 (m/v) para a de carboidratos. Os padrões utilizados para a quantificação dos ácidos orgânicos foram ácido acético (5 µL/mL), ácido propiônico (5 µL/mL), ácido valérico (100 µL/mL), ácido succínico (1,2 mg/mL), ácido oxálico (2,4 mg/mL), ácido málico (1,5 mg/mL), ácido cítrico (2,5 mg/mL) e ácido láctico (1,95 mg/mL). E para a quantificação de carboidratos, sacarose (2,25 mg/mL), glicose (2,42 g/100g) e frutose (3,13 g/100g).

#### 4.2.2 Análises Microbiológicas

##### 4.2.2.1 Purificação da microbiota

Uma alíquota da amostra de mel dos seis tratamentos (amostra congelada por 180 dias, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a 20±5°C por 90 dias, maturada a 20±5°C por 180 dias, maturada a 30±5°C por 90 dias e maturada a 30±5°C por 180 dias) foi inoculada nos caldos *Brain Heart Infusion* (BHI) (meio de enriquecimento) e de *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) (seletivo para *Lactobacillus*) e mantida em estufa a 37°C por 72 h e nos caldos *Manitol Yeast Peptone* (MYP) (seletivo para *Bacillus*) e *Yeast Malt* (YM) (seletivo para leveduras), em mesa agitadora orbital (Tecnal - TE 141, USA) a 230 rpm a 30°C por 72 h. Os caldos em que constatou-se a formação de massa celular foram centrifugados e lavados com solução salina a 0,7% (m/v), por três vezes. A massa celular foi resuspendida na solução e

transferida para placas contendo ágar BHI, MRS, MYP e YMA. As placas com ágar BHI e MRS foram mantidas em estufa a 37°C por 72 h e as com ágar MYP e YMA a 30°C por 24 h. Para o isolamento dos microrganismos foi executada a técnica de esgotamento em ágar. Para adequada purificação, repetiu-se este procedimento por no mínimo três vezes, sendo o processo acompanhado pela leitura em microscópio ótico (Leica - DM E, USA) e a comprovação pela avaliação da coloração de Gram (RIBEIRO; SOARES, 1993).

#### 4.2.2.2 Extração do DNA Genômico de Bactérias

A amostra devidamente purificada foi ressuspendida em caldo BHI e 3 mL do caldo contendo as células foi centrifugado a 9982 g (rcf) por 3 minutos (Eppendorf – 5414, USA). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 450 µL de tampão TE (Tris 10mM/EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 50 mM, pH 7,5). Foram adicionados 30 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) (10% m/v), agitou-se até dissolver a massa e incubou em estufa a 37°C por 1 hora. Adicionaram-se 450 µL de fenol/clorofórmio (25:24) e homogeneizou-se por inversão até as duas fases estarem completamente misturadas. Centrifugou-se por 20 minutos a 9982 g (rcf). O sobrenadante foi transferido para um microtubo e adicionado novo volume de fenol/clorofórmio. Repetiu-se o procedimento de transferência do sobrenadante para um microtubo e adicionou 1/10 do volume de acetato de sódio (3M) e 0,6 volumes de etanol absoluto a -20°C. Misturou-se com cuidado por inversão. A amostra foi mantida em *freezer* (-20°C) por aproximadamente 1 hora. Centrifugou a 9982 g (rcf) por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 300 µL de etanol a 70% (v/v) ao sedimento e centrifugou-se a 9982 g (rcf) por 10 minutos. O precipitado que continha o DNA extraído foi mantido à temperatura ambiente por 1 hora e então foi ressuspendido em 100 µL de tampão TE e este foi utilizado para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.2.2.3 Extração do DNA Genômico de Leveduras

A amostra purificada foi ressuspendida em caldo BHI e 3 mL do caldo contendo as células foi centrifugado a 9982 g (rcf) por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se um volume de pérolas de vidro, 200 µL da solução tampão A (2% Triton X-100 (v/v), 1% SDS (m/v), 100 mM de NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) e 200 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 9982 g (rcf) por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um microtubo e adicionado 1 mL de etanol absoluto a -20°C. Misturou-se com cuidado por inversão. A amostra foi mantida em *freezer* (-20°C) por aproximadamente 1 hora. Centrifugou-se a 9982 g (rcf) por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O precipitado que continha o DNA extraído foi mantido à temperatura ambiente por

1 hora e então foi ressuspenso em 20 µL de tampão TE e este foi utilizado para a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 4.2.2.4 Identificação molecular das bactérias por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

A identificação molecular das bactérias foi feita pela técnica de amplificação, com os iniciadores FD1 e RD1 descritos por Weisburg (1991), específicos para região ribossomal de bactérias. A reação de PCR, a partir do DNA obtido, foi feita tendo um volume final de 20 µL contendo 1,0 µL de tampão para PCR (10x); 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 0,4 µL da solução dos trifosfatos de desoxinucleotídeos (25 mM); 1,5 µL de cada iniciador (10 µM); 2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 2,0 µL da amostra de DNA e 9,6 µL de água ultra pura. Cada reação foi submetida a 30 ciclos de amplificação no termociclador (TECHNE – TC 512, USA). O primeiro ciclo foi precedido de uma desnaturação inicial por 4 minutos, a 94°C. Cada ciclo de amplificação consistiu em uma desnaturação a 94°C, durante 60 segundos, pareamento dos iniciadores a 55°C, durante 30 segundos e extensão a 72°C, por 2 minutos. O último ciclo foi sucedido por uma extensão final por 10 minutos, a 72°C. O produto de amplificação foi avaliado por visualização em eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v), corado com *SyberSafe* (*Invitrogen*) e registrado digitalmente.

#### 4.2.2.5 Identificação molecular das leveduras por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR)

A identificação molecular das leveduras foi realizada pela técnica de amplificação, utilizando-se os iniciadores ITS1 e ITS4, específicos para região ribossomal de leveduras, descritos por Gardes e Bruns (1993) e White et al. (1990), respectivamente. A reação de PCR, a partir do DNA obtido, foi feita em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão para PCR (10x); 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM); 2 µL da solução dos trifosfatos de desoxinucleotídeos (2,5 mM); 1,25 µL de cada iniciador (10 µM); 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL), 2,0 µL da amostra de DNA e 15 µL de água ultra pura. Cada reação foi submetida a 35 ciclos de amplificação no termociclador (TECHNE – TC 512, USA). O primeiro ciclo foi precedido de uma desnaturação inicial de 5 minutos, a 95°C. Cada ciclo de amplificação consistiu em uma desnaturação a 94°C, por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 60°C, durante 1 minuto e extensão a 65°C, por 1 minuto. O último ciclo foi sucedido por uma extensão final por 5 minutos, a 65°C. O produto de amplificação foi avaliado por visualização em eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v), corado com *SyberSafe* (*Invitrogen*) e registrado digitalmente.

#### 4.2.2.6 Sequenciamento do DNA

As amostras foram sequenciadas pelo método Sanger (ABI3500 Genetic Analyser), usando os iniciadores *forward* e *reverse* com o uso de termociclador (*BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, Applied Biosystems, USA).

#### 4.2.3 Análise Sensorial

As amostras pasteurizada e congelada, congelada por 180 dias, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  e  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias foram submetidas a análise descritiva e de aceitação. A análise foi aprovada pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina pelo parecer número 1.124.653 (CAAE: 46195515.9.0000.5231).

As análises sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. Os testes foram feitos em cabines individuais, sob iluminação fluorescente (luz do dia  $D_{65}$ ). Em cada teste (análise descritiva ou aceitação) porções de 25 gramas de cada amostra à temperatura ambiente foram apresentadas uma de cada vez em ordem aleatória, em copos brancos descartáveis, codificados com números aleatórios de três dígitos, acompanhadas de colher descartável e água potável à temperatura ambiente para lavar a boca antes e entre os testes.

##### 4.2.3.1 Análise Descritiva Quantitativa

Primeiramente, foram recrutados 22 voluntários, via contato pessoal, dentre alunos, funcionários e docentes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CCA/UEL. Após esclarecimento sobre o teste, àqueles que aceitaram participar foi solicitado a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice B) e que respondessem um questionário para obtenção de informações sobre cada um (interesse, disponibilidade de tempo para realização dos testes, saúde, frequência de consumo do produto a ser avaliado e facilidade de expressão) (Apêndice A).

Os voluntários foram pré-selecionados com base nos seus desempenhos em testes de reconhecimento de odores e gostos básicos (MEILGAARD et al., 1998). No teste de reconhecimento de odores, os voluntários foram solicitados a descrever 14 odores diferentes (Apêndice E). O critério de seleção foi acerto mínimo de 70%. Para reconhecimento dos gostos básicos, os voluntários receberam 30 mL de cada uma das seguintes soluções aquosas: sacarose 2%, ácido cítrico 0,07%, cloreto de sódio 0,2%, cafeína 0,07%, monoglutamato de sódio 0,035%. Foram solicitados a identificá-los, e o critério de seleção foi 100% de acerto (Apêndice F). Após esta etapa, foi realizado o levantamento dos termos descritores (atributos)

do mel pelos julgadores pré-selecionados empregando-se o método de rede (MOSKOWITZ, 1983) (Apêndice G). Neste método, cada julgador avaliou amostras de mel (maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , comercial, pasteurizada e congelada) aos pares e indicou descritores de diferenças e semelhanças em relação à aparência, aroma sabor e textura para cada par de amostra, e por meio de consenso entre os julgadores foram escolhidos os descritores mais citados que compuseram a análise (Quadro 3). Os julgadores em consenso definiram os atributos levantados, sugeriram as amostras de referência qualitativa e quantitativa e elaboraram a ficha de avaliação (Quadro 4). Seguiram-se as sete sessões de treinamento dos julgadores com as amostras de referência. Posteriormente foi feita a seleção final dos julgadores, no qual os mesmos avaliaram 3 diferentes amostras (maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ , congelada e pasteurizada) em 3 repetições, empregando-se a ficha de avaliação elaborada. Os dados de cada julgador e de cada atributo foram submetidos a análise de variância e teste F. Os critérios de seleção de cada julgador foram o poder de discriminação de amostras ( $p$  de  $F_{\text{amostra}} \leq 0,05$ ), repetibilidade de avaliação ( $p$  de  $F_{\text{repetições}} \geq 0,5$ ) e a concordância de cada julgador com a equipe para atributo. A concordância foi avaliada por meio de comparação das médias das amostras obtidas para cada julgador com as médias da equipe (DAMÁSIO; COSTELL, 1991). Foram considerados treinados 13 julgadores, e estes compuseram a equipe sensorial.

As amostras do estudo foram avaliadas pela equipe segundo um delineamento experimental de blocos casualizados repetido três vezes, sendo tratamento as amostras e blocos os julgadores.

**Quadro 3** – Termos descritores e suas respectivas definição e referências.

Termo Descritor	Definição	Referência
<b>Aparência</b>		
Cor Amarela	Intensidade de coloração amarela no produto	<u>Fraca</u> : 4 g de Xarope de Glicose de Milho marca Karo + 25 mL de água <u>Intensa</u> : 18 g de Xarope de Glicose de Milho marca Karo
Brilho	Reflexão da luz na superfície da amostra	<u>Ausência</u> : 40 g de gel de brilho + 0,3 g de corante em pasta gel cor branco + 0,5 g de farinha de trigo na superfície <u>Intenso</u> : 40 g de gel de brilho + 0,3 g de corante em pasta gel cor branco
Transparência	Passagem de luz que através da amostra (permite visualização através da amostra)	<u>Pouco</u> : 50 mL de água <u>Muito</u> : 40 g de gel de brilho
Bolhas	Presença de pequenas bolhas de ar na superfície do mel	<u>Ausência</u> : 25 g do mel pasteurizado <u>Muito</u> : 25 g do mel maturado a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ após agitação
Pontos Escuros	Presença de pontos escuros em suspensão no mel	<u>Ausência</u> : 25 g de Xarope de Glicose de Milho marca Karo

		<u>Muito:</u> 25 g Xarope de Glicose de Milho marca Karo + 0,01 g de pó de café torrado e moído
<b>Aroma</b>		
Ácido	Aroma proveniente dos compostos ácidos voláteis	<u>Fraco:</u> 12 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel <u>Intenso:</u> 12 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel + 0,5 g de extrato de própolis marca Apisnutri
Doce	Aroma proveniente de alimentos açucarados	<u>Fraco:</u> 5 g de Xarope de Glicose de Milho marca Karo + 25 mL de água <u>Intenso:</u> 25 g de Xarope de Glicose de Milho marca Karo + 25 mL de água
Fermentado	Aroma proveniente de alimentos fermentados	<u>Fraco:</u> 15 g do mel congelado <u>Intenso:</u> 15 g do mel maturado a 30±5 °C
Mel	Aroma característico de mel	<u>Fraco:</u> 5 g de mel florada predominantemente silvestre + 10 mL de água <u>Intenso:</u> 15 g de mel florada predominantemente silvestre
<b>Sabor</b>		
Gosto Ácido	Sensação característica produzida na ingestão de alimentos ácidos	<u>Fraco:</u> 35 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel + 0,1 g de extrato de própolis marca Apisnutri pH final 3,90 <u>Intenso:</u> 35 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel + 0,7 g de extrato de própolis marca Apisnutri pH final 3,83
Gosto Doce	Sensação característica produzida na ingestão de alimentos açucarados	<u>Fraco:</u> Solução Aquosa de Sacarose a 3% (g/100g) <u>Intenso:</u> Solução Aquosa de Sacarose a 12% (g/100g)
Sabor Fermentado	Sensação característica produzida na ingestão de fermentados	<u>Fraco:</u> 25 g do mel congelado <u>Intenso:</u> 25 g do mel maturado a 30±5 °C
Sabor de Mel	Sensação característica produzida na ingestão de mel	<u>Fraco:</u> 25 g de mel florada predominantemente silvestre + 25 mL de água <u>Intenso:</u> 25 g de mel florada predominantemente silvestre
<b>Textura</b>		

Viscosidade	Força necessária de sucção para remover o produto de uma colher	<p><u>Pouco:</u> 20 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel + 5 mL de água (460 cP)</p> <p><u>Muito:</u> 20 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel a 7 °C (1150 cP)</p>
Arenosidade	Sensação de areia na cavidade bucal	<p><u>Ausência:</u> 30 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel</p> <p><u>Intensa:</u> 30 g de mel florada predominantemente laranjeira Casa do Mel + 2 g de sacarose</p>

**FONTE:** o próprio autor

**Quadro 4 – Ficha para análise descritiva quantitativa.**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Por favor, prove a amostra e avalie a intensidade percebida para cada atributo colocando um traço vertical no ponto correspondente em cada escala.

Amostra: \_\_\_\_\_

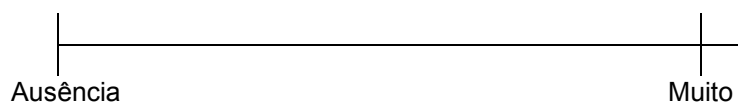
**APARÊNCIA**

Cor Amarela

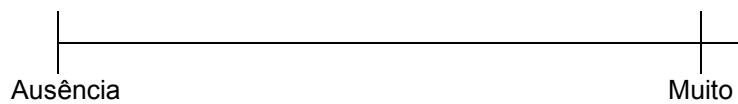
Brilho

Transparência

Bolhas

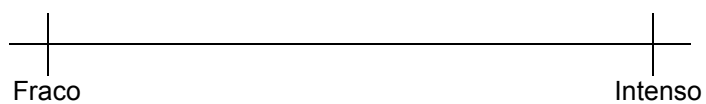


Pontos Escuros

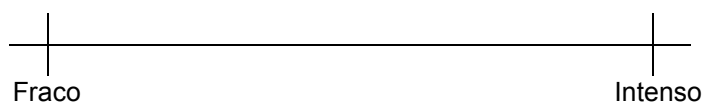


AROMA

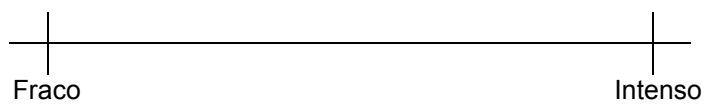
Ácido



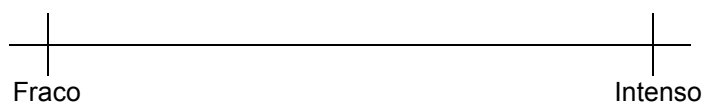
Doce



Fermentado

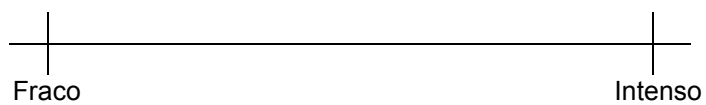


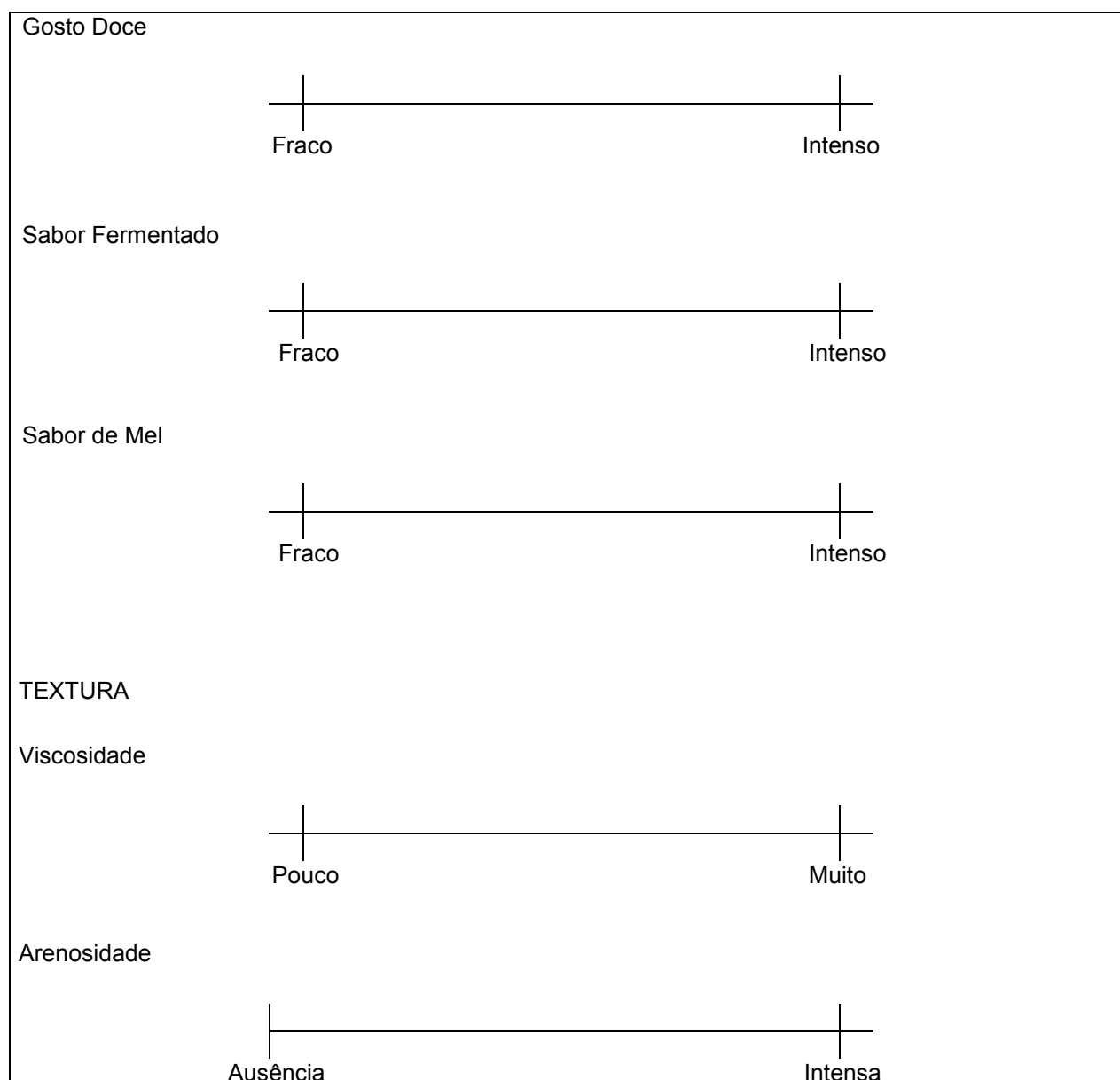
Mel



SABOR

Gosto Ácido





**FONTE:** o próprio autor

#### 4.2.3.2 Aceitação Sensorial

A aceitação das amostras de mel foi medida com escala hedônica híbrida de 10 cm (VILLANUEVA; PETENATE; DA SILVA, 2005), onde 0 = desgostei extremamente, 5 = nem gostei, nem desgostei e 10 = gostei extremamente (Quadro 5). Avaliaram-se os atributos aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global. Foram empregados 100 consumidores voluntários, como julgadores, recrutados via contato pessoal, dentre alunos, funcionários e docentes do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do CCA/UDEL. Antes do teste os consumidores foram esclarecidos sobre o mesmo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice D) e responderam um questionário para obtenção de informação (interesse, disponibilidade de tempo para realização dos testes, saúde e frequência



### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

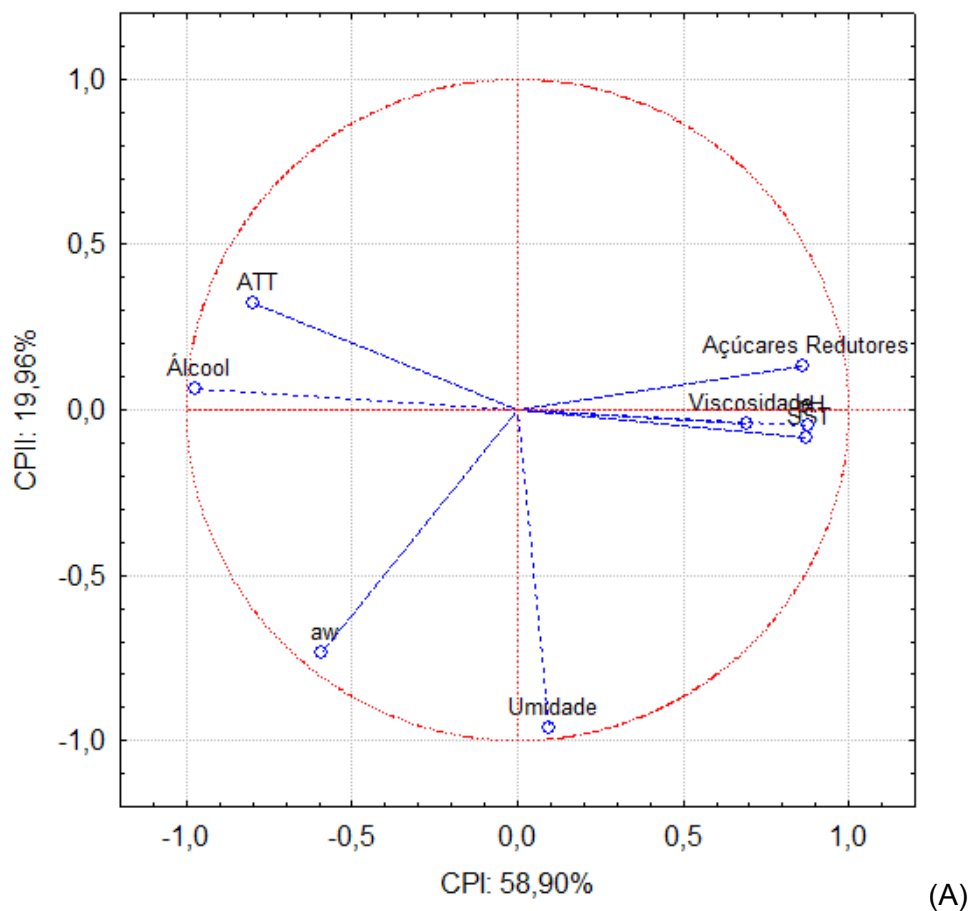
Os dados das análises físico-químicas foram tratados por análise de variância (ANOVA) com um fator (amostra de mel), os da aceitação por ANOVA com dois fatores e os da sensorial descritiva por ANOVA com dois fatores e interação (amostras x julgadores). As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, em nível de 5% de significância. Os dados da análise descritiva quantitativa, ressonância magnética nuclear e físico-químicos também foram avaliados pela análise de componente principal (ACP), empregando-se o *software* Statistica 10.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

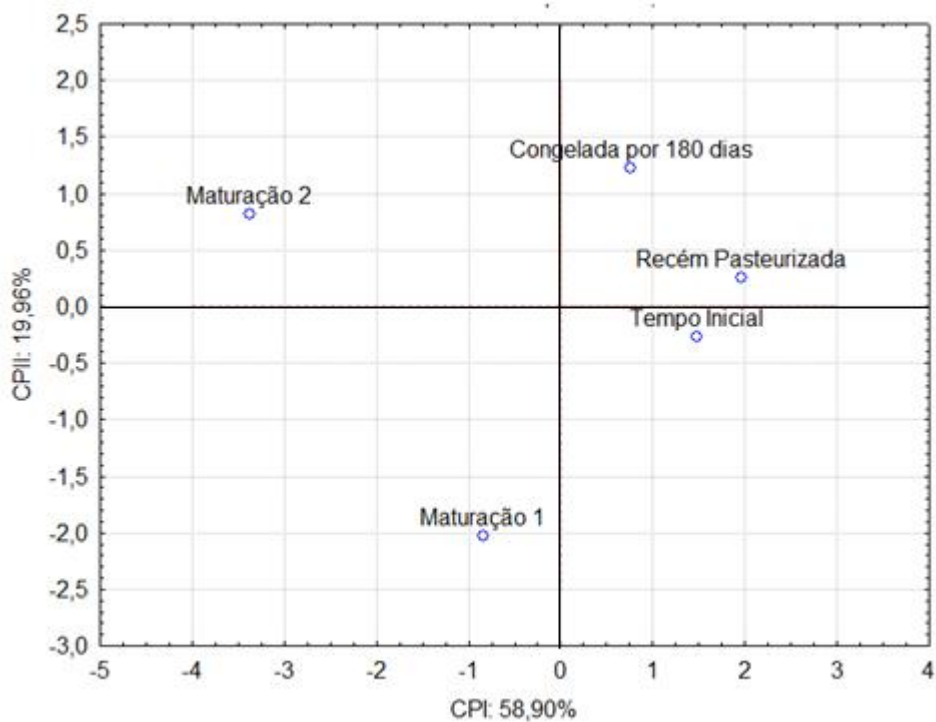
### 5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para avaliar as mudanças físico-químicas ocorridas no mel devido aos diferentes tratamentos de conservação, os dados foram submetidos à análise de componentes principais (Figura 8A). Os dois primeiros componentes principais (CP) tiveram explicação acumulada de 78,86% da variabilidade dos dados originais, o que atende ao critério mínimo sugerido por Jolliffe (2002). Em cada CP, os parâmetros que apresentaram uma correlação ( $r$ ) maior ou igual a  $\pm 0,65$  foram considerados importantes (CHAPMAN et al., 2001). Os parâmetros sólidos solúveis totais ( $r = +0,87$ ), pH ( $r = +0,87$ ), açúcares redutores ( $r = +0,86$ ), viscosidade ( $r = +0,69$ ), acidez total titulável ( $r = -0,79$ ) e álcool ( $r = -0,97$ ) foram os que mais contribuíram para a explicação dos 58,90% do CPI. Para o CPII (19,96% de explicação), contribuíram a atividade de água ( $r = -0,72$ ) e umidade ( $r = -0,96$ ).

**Figura 9** – Projeções dos parâmetros físico-químicos (A) e amostras de mel tratadas por diferentes métodos de conservação (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPII).



(A)



(B)

**SST: sólidos solúveis totais; ATT: acidez total titulável**

As correlações significativas ( $p < 0,05$ ) estão destacadas na Tabela 2 e comentadas a seguir.

**Tabela 2** – Coeficientes de correlação entre os parâmetros físico-químicos.

	SST*	pH	A <sub>w</sub>	Viscosidade	Umidade	Álcool	ATT*	AR*
SST*	1,00	-	-	-	-	-	-	-
pH	<b>0,56</b>	1,00	-	-	-	-	-	-
A <sub>w</sub>	<b>-0,51</b>	<b>-0,38</b>	1,00	-	-	-	-	-
Viscosidade	<b>0,69</b>	<b>0,38</b>	<b>-0,61</b>	1,00	-	-	-	-
Umidade	0,30	0,01	0,59	0,21	1,00	-	-	-
Álcool	<b>-0,86</b>	<b>-0,90</b>	<b>0,50</b>	<b>-0,53</b>	-0,11	1,00	-	-
ATT*	<b>-0,50</b>	<b>-0,86</b>	0,24	<b>-0,62</b>	-0,30	<b>0,74</b>	1,00	-
AR*	<b>0,81</b>	<b>0,80</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,29</b>	-0,03	<b>-0,94</b>	<b>-0,49</b>	1,00

\*SST: Sólidos Solúveis Totais; ATT: Acidez Total Titulável; AR: Açúcares Redutores. Valores em negrito são significativos ( $p < 0,05$ ).

Houve correlação positiva e significativa entre sólidos solúveis totais e pH; sólidos solúveis totais e viscosidade; sólidos solúveis totais e açúcares redutores; pH e viscosidade; pH e açúcares redutores; atividade de água e álcool; viscosidade e açúcares redutores e álcool e acidez total titulável. E correlação negativa e significativa entre sólidos solúveis totais e atividade de água; sólidos solúveis totais e álcool; sólidos solúveis totais e acidez total titulável; pH e atividade de água; pH e álcool; pH e acidez total titulável; atividade de água e viscosidade; atividade de água e açúcares redutores; viscosidade e álcool; viscosidade e acidez total titulável; álcool e açúcares redutores e acidez total titulável e açúcares redutores. Isso significa que sólidos solúveis totais, teor de açúcares e pH influenciam diretamente na viscosidade das amostras, que o teor de açúcares tem relação direta com os valores de pH e sólidos solúveis e que o teor de álcool tem relação direta com os valores de acidez e atividade de água. Por outro lado, o conteúdo de açúcar influencia na produção de álcool, acidez total titulável e atividade de água e a redução dos sólidos solúveis e pH resulta no aumento da atividade de água, álcool e acidez. A viscosidade das amostras é inversamente proporcional aos valores de atividade de água, álcool e acidez.

Na Figura 9B cada ponto corresponde a um tratamento. De acordo com a localização dos tratamentos no plano CPI x CPII, nota-se que a amostra maturada a  $30\pm 5^\circ\text{C}$  (maturação 2) destacou-se pelo maior teor de ácidos e álcool. A maturada a  $20\pm 5^\circ\text{C}$  (maturação 1) pelo elevado teor de umidade e atividade de água e as amostras tempo inicial, congelada e recém-pasteurizada, pelos maiores valores de sólidos solúveis totais, viscosidade, pH e açúcares redutores, indicando que a amostra congelada ou recém-pasteurizada eram semelhantes a amostra original (tempo inicial).

Os valores dos parâmetros físico-químicos estão apresentados na Tabela 3. A amostra tempo inicial apresentou pH e teor de açúcares redutores próximos ao da amostra de mel de eucalipto ( $3,7\pm 0,04$  e  $70,7\pm 0,19$ ) avaliada por Barth et al. (2005). A viscosidade e umidade diferiram das determinadas por Alves et al. (2005) em mel de *Melipona mandacaia*. Os autores verificaram média de 59,60 cP e 28,78 g/100g para viscosidade e umidade, respectivamente. Esses atributos variam consideravelmente de acordo com a fonte vegetal da qual é derivado o mel, espécie da abelha e condições meteorológicas da colheita, o que justifica grande variação nos valores estudados.

**Tabela 3** – Características físico-químicas das amostras de mel.

	Tempo Inicial	Congelada por 180 dias	Recém Pasteurizada	Maturação 1/ 180 dias (20±5°C)	Maturação 2/ 180 dias (30±5°C)
Umidade (g/100g)	24,50±0,36 <sup>ab</sup>	23,70±0,26 <sup>c</sup>	24,10±0,24 <sup>abc</sup>	24,80±0,62 <sup>a</sup>	23,90±0,74 <sup>bc</sup>
A <sub>w</sub>	0,6751±0,01 <sup>b</sup>	0,6760±0,01 <sup>b</sup>	0,6684±0,01 <sup>b</sup>	0,7085±0,02 <sup>a</sup>	0,6870±0,01 <sup>b</sup>
Viscosidade (cP)	993±98,74 <sup>a</sup>	463±5,51 <sup>b</sup>	1104±66,84 <sup>a</sup>	525±52,80 <sup>b</sup>	514±27,54 <sup>b</sup>
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	75,30±0,50 <sup>a</sup>	74,73±0,26 <sup>a</sup>	74,83±1,29 <sup>a</sup>	74,52±0,06 <sup>a</sup>	74,14±1,05 <sup>a</sup>
pH	3,73±0,06 <sup>b</sup>	3,83±0,09 <sup>ab</sup>	3,85±0,04 <sup>a</sup>	3,75±0,06 <sup>ab</sup>	3,56±0,03 <sup>c</sup>
Acidez Total Titulável (meq/kg)	23,87±1,21 <sup>ab</sup>	23,94±2,36 <sup>ab</sup>	21,36±1,44 <sup>b</sup>	23,12±1,49 <sup>ab</sup>	26,10±1,20 <sup>a</sup>
Álcool (g/100g)	-	-	-	0,2±0,15 <sup>b</sup>	0,6±0,15 <sup>a</sup>
Açúcares Redutores (g/100g)	70,27±3,67 <sup>ab</sup>	73,75±3,81 <sup>a</sup>	64,96±1,25 <sup>ab</sup>	60,02±2,56 <sup>ab</sup>	49,22±0,96 <sup>b</sup>

**Média de três medidas ± Desvio Padrão; Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo Teste de Duncan (p ≤ 0,05).**

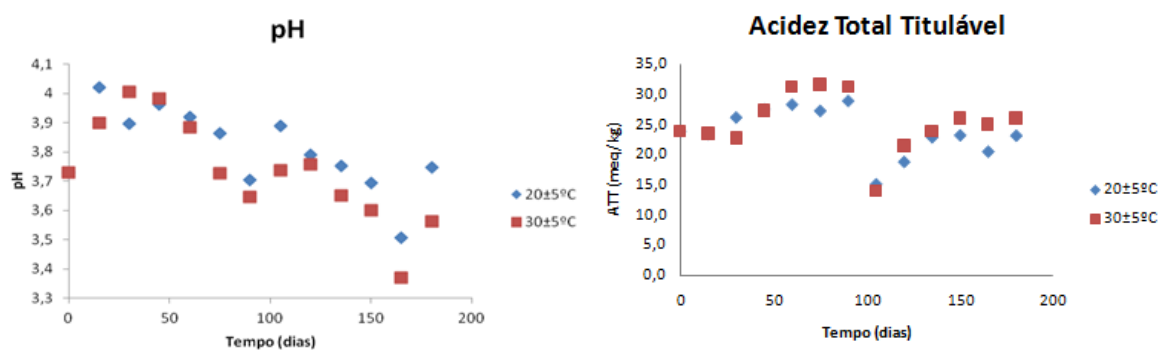
O congelamento ocasionou a redução da umidade e viscosidade das amostras. No congelamento ocorre um abaixamento brusco da temperatura, a fim de evitar perdas de qualidade no alimento, e isso pode afetar a retenção de umidade pela formação de cristais de gelo (POTTER, 1995). A viscosidade de fluidos é influenciada tanto pela umidade quanto pela temperatura da amostra (BEDFORD; SHULZE, 1998). No presente estudo observou-se um resultado não esperado, ou seja, com o congelamento e descongelamento (para a medida a 25°C) da amostra, apesar da redução da umidade (sem alteração da atividade de água), houve a redução da viscosidade. No mel, a viscosidade também é influenciada pela concentração, forma e tipo de açúcares, além dos outros componentes. Tais componentes (dextrana, proteínas, ácidos orgânicos, óleos essenciais, vitaminas, minerais, grãos de pólen) mesmo presentes em baixas concentrações tem efeito significativo sobre a viscosidade do mel (PODADERA, 2007; RYBAK-CHIELEWSKA, 2004). Substâncias de elevada massa molecular presentes em solução e/ou sólidos dispersos em fase fluida podem permanecer suspensos ou

decantados e influenciar na viscosidade (RAO, 1977). Não foram levantados estudos do efeito do congelamento (-18°C) e posterior descongelamento (25°C) sobre a viscosidade do mel.

A pasteurização causou aumento no pH. Esse mesmo efeito foi observado por Freitas et al. (2010) em méis de *Melipona subnitida*. Os autores verificaram que houve aumento do pH com o tempo de tratamento térmico. Uma possível explicação para este fato seria a volatilização dos ácidos orgânicos presentes, em particular os ácidos voláteis, com o tratamento térmico, o que resultaria em diminuição da acidez e consequente aumento do pH (ARAÚJO, 1995).

Não houve diferença significativa entre as amostras maturadas (1 e 2) e a do tempo inicial quanto aos valores de umidade, sólidos solúveis totais e açúcares redutores. Porém para maior temperatura de maturação (Maturação 2), o pH final foi menor que do tempo inicial e maturação 1, conforme também demonstrado na Figura 10 para pH e acidez total titulável. Esse resultado corrobora a discussão de Finola, Lasagno e Marioli (2007) que citam que valores elevados de acidez em mel podem indicar ocorrência de fermentação dos açúcares, em condições favoráveis de umidade e atividade de água, resultando no aumento da acidez e redução do pH. Os valores de pH e acidez obtidos na maturação 2 (30±5°C) foram próximos aos determinados por Carvalho et al. (2009) em mel *Melipona scutellaris*, da Costa do Sauipe, 3,57 e 25,75 meq/kg, respectivamente.

**Figura 10 – Monitoramento do pH durante os 180 dias de maturação.**

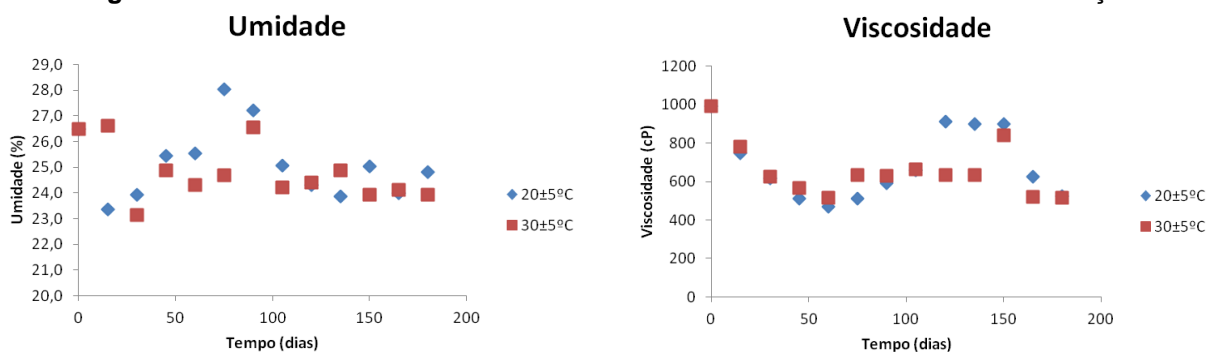


O processo de maturação também influenciou o aumento da atividade de água (maturação em menor temperatura) e a produção de álcool (maturação em maior temperatura). É sabido que a atividade de água ( $a_w$ ) é um parâmetro que indica a água disponível no alimento para reações químicas, enzimáticas e desenvolvimento microbiano (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010), quanto maior sua interação com os componentes do alimento, menor sua disponibilidade para reações. Os valores de atividade de água das amostras maturadas foram similares aos encontrados por Anacleto et al. (2009) em méis de abelhas jataí, que relataram valor médio de  $0,66 \pm 0,06$ . A produção de álcool foi maior na amostra da maturação 2, e isso pode ter ocorrido devido a temperatura ter se aproximado mais à ótima de crescimento dos microrganismos responsáveis pela fermentação.

A viscosidade das amostras maturadas a 30 e 20±5°C (514 e 525 cP, respectivamente) foram inferiores à da amostra no tempo inicial. Esses resultados contrastam com a pesquisa de Silva et al. (2010) em que analisaram o comportamento reológico do mel de *Apis mellifera* nas temperaturas de 20, 25, 30, 35 e 40°C em função do tempo de armazenamento de 0, 45 e 90 dias. Os autores verificaram que o tempo de armazenamento não provocou aumentos ou reduções significativas, mas o aumento de temperatura resultou em diminuições de viscosidade. Porém os autores não informaram as demais características das amostras que influenciam nesse valor, principalmente a umidade. Méis de meliponíneos caracterizam-se pela fluidez, devido ao alto teor de água, uma vez que a viscosidade do mel é inversamente proporcional ao seu conteúdo, ou seja, quanto menor o conteúdo de água mais alta será sua viscosidade (CRANE, 1983). A Figura 11 confirma que durante o período de maturação, amostras contendo os maiores valores de umidade, tiveram os menores valores de viscosidade, e vice-versa.

A viscosidade também pode ser influenciada pelos teores de álcool e ácidos nos alimentos. Penha et al. (2003) avaliando o perfil sensorial de licor verificaram que quanto maior a porcentagem de álcool e ácido, menor a viscosidade.

**Figura 11** – Monitoramento da umidade e viscosidade durante os 180 dias de maturação.



A viscosidade também está relacionada com o estado físico do açúcar na amostra e este por sua vez tem relação direta com a umidade e temperatura (ESCRIVÁ et al., 1998). Yanniotis et al. (2006) consideram o mel um fluido newtoniano, entretanto há alguns trabalhos que descrevem um comportamento não newtoniano, atribuído à presença de colóides ou açúcares de alto peso molecular. O mel no estado natural apresenta açúcar em núcleos, que se cristalizam e tornam-se bem duros quando resfriados em temperaturas baixas (menores que 10°C) ou ficam com uma consistência cremosa quando resfriados a temperaturas entre 14 e 18°C. Mel com menos núcleos de cristais, cristalizam mais lentamente formando cristais maiores, resultando em uma estrutura estratificada e conseqüentemente com maior viscosidade. Quando o mel é aquecido e liquefeito, a recristalização não é uniforme e tende-se

a formar aglomerados em todo o recipiente (RYBAK-CHMIELEWSKA, 2004), que também aumentam a viscosidade.

A glicose pode cristalizar-se como D-glicose monohidratada na forma cristalina estável em temperatura abaixo de 50°C, como D-glicose anidra na forma estável entre 50 e 80 °C e forma  $\beta$ -anidra estável acima de 80°C. Porém, em soluções saturadas com frutose, a temperatura de transição da glicose monohidratada para glicose anidra é por volta dos 30°C. A cristalização da glicose no mel conduz a diminuição dos sólidos resultando na diluição da forma amorfa, que por sua vez aumenta a atividade de água (VENIR, 2010). Além disso, a alta umidade acelera a cristalização dos açúcares, aumentando a atividade de água, que afeta diretamente a viscosidade (YANNIOTIS et al., 2006).

Não foi detectada a presença de hidroximetilfurfural (HMF) em nenhuma das amostras. O teor de HMF é um parâmetro utilizado para controlar o tratamento térmico limitante para a pasteurização do mel, pois é uma característica resultante da transformação dos açúcares do mel à medida que este é aquecido acima de 70°C ou armazenado por longo tempo em temperaturas elevadas (FREITAS et al., 2010). A formação de HMF modifica o valor nutricional do mel e indica que houve perda de enzimas, principalmente diastase (ARAÚJO et al., 2006), sendo assim as temperaturas utilizadas nesta pesquisa, na pasteurização e maturação, inferiores a 70°C, preservaram as características naturais e nutricionais do mel quando observado pelo parâmetro do HMF.

As diferentes temperaturas utilizadas na maturação influenciaram os teores de umidade, atividade de água, pH e álcool (Tabela 3). Na maior temperatura de maturação (30±5°C) foram encontrados os menores teores de umidade, atividade de água e pH e maior a produção de álcool.

Os valores da tonalidade cromática ( $H^*$ ) de todas as amostras ficaram próximas ao amarelo puro, representado pelo ângulo de 90° (Tabela 4 e Figura 7), sendo que as amostras pasteurizada e maturada a 20±5°C (maturação 1) apresentaram maiores valores que as amostras tempo inicial, congelada e maturada a 30±5°C. A coloração amarelada característica do mel também foi comprovada por valores positivos do componente  $b^*$ , no qual a maior temperatura de maturação contribuiu para o aumento da coloração, e baixos do componente  $a^*$ , que acabam não influenciando na cor do mel. A pureza da cor ( $C^*$ ) foi maior na amostra maturada a 30±5°C (maturação 2), e esta amostra só diferiu da recém pasteurizada em relação a luminosidade. Em colorimetria, saturação ou grau de pureza da cor é um parâmetro que especifica a qualidade de um matiz de cor pelo grau de mesclagem deste com a cor branca, sendo usual referir-se também à refletância da amostra como um atributo daquela cor. Quanto maior seu valor, mais próximo do matiz puro, e mais escuro (AMARAL et al., 2012).

**Tabela 4** – Parâmetros de cor das amostras de mel.

	Tempo Inicial	Congelada por 180 dias	Recém Pasteurizada	Maturação 1/ 180 dias (20±5°C)	Maturação 2/ 180 dias (30±5°C)
H*	90,74±0,59 <sup>b</sup>	90,16±0,03 <sup>b</sup>	91,60±0,25 <sup>a</sup>	91,83±0,36 <sup>a</sup>	90,46±0,07 <sup>b</sup>
a*	-0,34±0,05 <sup>c</sup>	-0,05±0,01 <sup>a</sup>	-0,56±0,09 <sup>b</sup>	-0,58±0,15 <sup>b</sup>	-0,18±0,04 <sup>a</sup>
b*	19,14±0,57 <sup>b</sup>	17,95±0,07 <sup>b</sup>	20,04±0,10 <sup>b</sup>	17,93±1,79 <sup>b</sup>	22,40±1,73 <sup>a</sup>
C*	19,14±0,56 <sup>b</sup>	17,95±0,07 <sup>b</sup>	20,05±0,10 <sup>b</sup>	17,94±1,80 <sup>b</sup>	22,40±1,73 <sup>a</sup>
L*	53,67±0,92 <sup>ab</sup>	51,19±0,11 <sup>c</sup>	54,64±0,27 <sup>a</sup>	49,68±2,14 <sup>c</sup>	51,61±1,59 <sup>bc</sup>

Média de três medidas ± Desvio Padrão; Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ). L\*: luminosidade (0: preto e 100: branco); a\*: componente verde-vermelho (-a\*: verde, +a\*: vermelho); b\*: componente amarelo-azul (-b\*: azul, +b\*: amarelo), H\*: tonalidade cromática (0°: vermelho puro, 90°: amarelo puro, 180°: verde puro, 270°: azul puro), C\*: saturação.

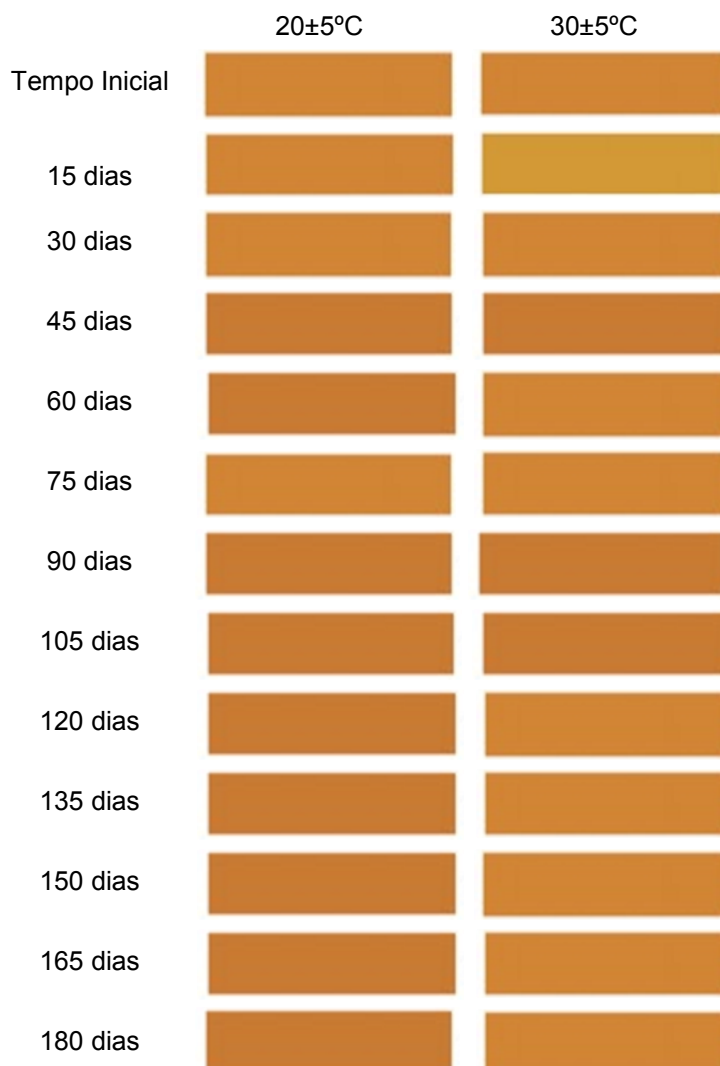
A cor do mel no mercado é classificada segundo escala de *Pfund*, de branco d'água a âmbar escuro, sendo que no mercado internacional a preferência é por méis com classificação entre extra branco e extra âmbar claro (MARCHINI et al., 2004). Não houve diferença estatística entre os valores de absorvância a 560 nm obtidos para as amostras (Tabela 5). A congelada e maturada a 20±5°C classificaram-se como âmbar claro e as demais como extra âmbar claro. O monitoramento segundo a escala de cor durante a maturação está ilustrado na Figura 12, que foi montada pela conversão dos valores médios de absorvância de cada amostra na cor descrita pela escala de *Pfund* indicada no Quadro 2.

**Tabela 5** – Valores de absorvância a 560nm para as amostras mel.

	Tempo Inicial	Congelada (180 dias)	Recém Pasteurizada	Maturação 1/ 180 dias (20±5°C)	Maturação 2/ 180 dias (30±5°C)
Cor (absorvância a 560 nm)	0,182±0,04 <sup>a</sup>	0,300±0,21 <sup>a</sup>	0,157±0,01 <sup>a</sup>	0,331±0,02 <sup>a</sup>	0,188±0,04 <sup>a</sup>

Média de três medidas ± Desvio Padrão; Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 12** – Classificação representativa da cor do mel de acordo com a escala de *Pfund* durante os 180 dias de maturação.



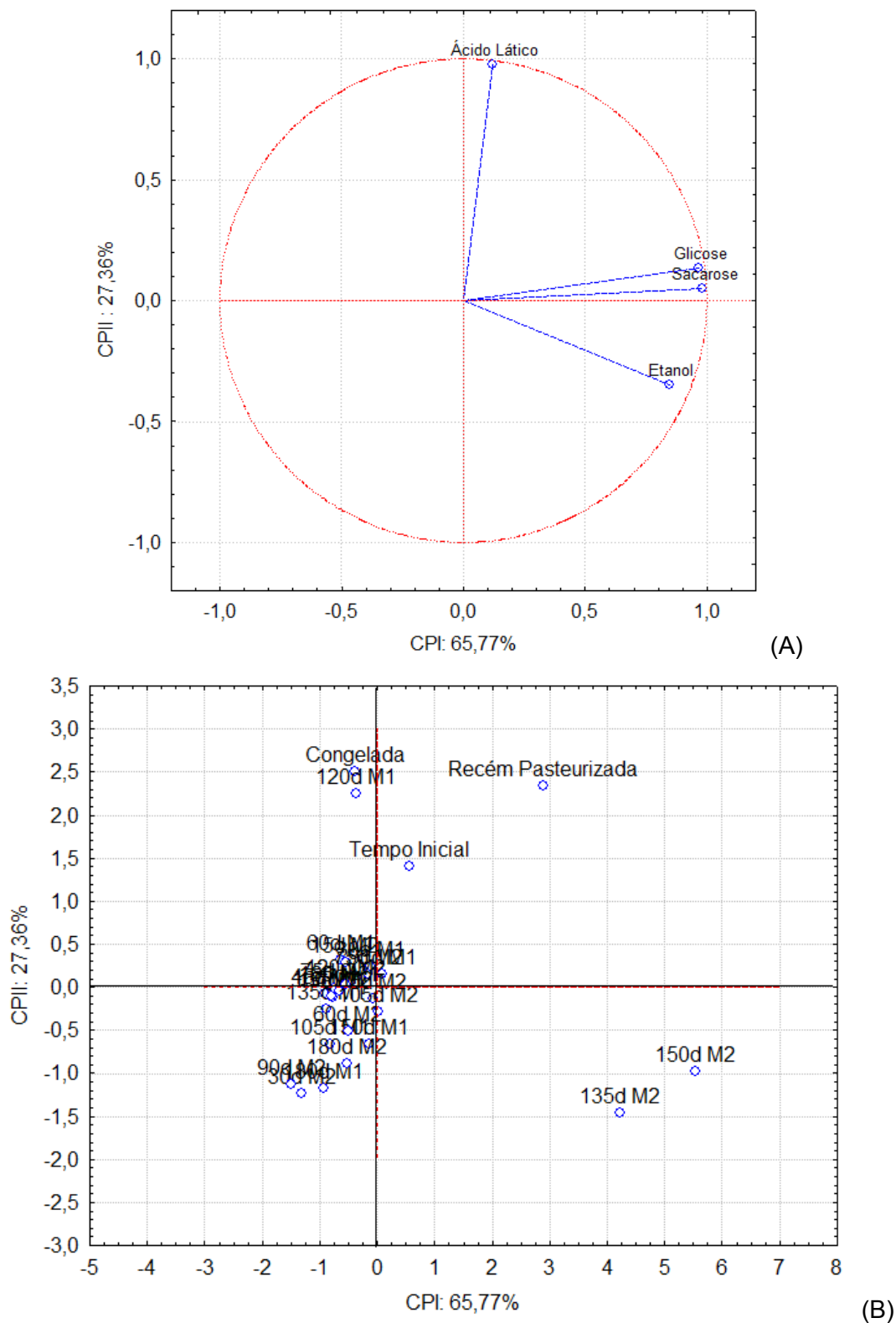
Correlacionando as duas escalas (sistema Cielab e *Pfund*), quanto maior os valores de H\* e menor os valores de L\*, mais próximos à coloração âmbar claro e quanto maior os valores de C\* e b\* e menores os valores de a\*, mais próximos à coloração extra âmbar claro. Moura (2006) avaliou a qualidade de méis de *Apis mellifera* L. durante seis meses, estocados em armazém construído com bloco cerâmico vazado (tratamento um) e armazém construído com bloco de concreto celular autoclavado (tratamento dois) e também não encontrou diferença estatística na cor (58,44 mm e 57,72 mm, respectivamente) na escala *Pfund* dos produtos armazenados em diferentes condições. Porém em suas amostras, ao longo de 150 dias de armazenamento houve um escurecimento médio de 25,49% e 23,53% para os tratamentos um e dois, respectivamente (variou de 51 a 64 mm para tratamento um e de 51 a 63 mm para tratamento dois). Este escurecimento é atribuído à diferença de temperatura e consequente produção de hidroximetilfurfural obtida em cada um dos tratamentos. Na presente

pesquisa, não houve diferença estatística nos valores de absorvância das amostras, assim como não houve produção de hidroximetilfurfural.

Para melhor visualizar os resultados obtidos pela ressonância magnética nuclear, os dados dos 27 tratamentos (descritos no item 4.2.1) foram submetidos à análise de componentes principais (Figura 13). O primeiro componente explicou 65,77% da variação total das variáveis originais e o segundo, 27,36%, totalizando 93,13% de explicação dos dados. Em cada componente, os atributos que apresentaram correlação ( $r$ ) maior ou igual a  $\pm 0,65$  foram considerados importantes (CHAPMAN et al., 2001) para sua explicação. Os compostos etanol ( $r = +0,84$ ), glicose ( $r = +0,96$ ) e sacarose ( $r = +0,98$ ) foram considerados importantes para o primeiro componente, e o ácido láctico ( $r = +0,97$ ) para o segundo.

Na Figura 13B as amostras que estão próximas ao ponto central do gráfico não se destacaram em nenhum dos componentes analisados. As amostras congelada, pasteurizada, tempo inicial e 120d M1 localizadas na parte superior do gráfico caracterizam-se por maior teor de ácido láctico, e as 135d M2 e 150d M2, localizadas na parte inferior a direita, por maiores teores de etanol, glicose e sacarose. Esses dados indicam que o ácido láctico é característico das amostras sem maturar, que o etanol é produzido durante a maturação, sendo mais acentuado na maturação 2, em maior temperatura (Tabela 2) e que os teores de glicose e sacarose são diretamente proporcionais.

**Figura 13** – Projeções dos compostos (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPPI).



**M1: maturação a 20±5°C; M2: maturação a 30±5°C. Os números seguidos da letra 'd' indicam o tempo (dias) de maturação**

Por meio da análise de correlação (Tabela 6), confirma-se que houve correlação positiva e significativa entre sacarose e glicose e correlação negativa e significativa entre etanol

e ácido láctico, ou seja, há relação direta entre os teores de sacarose e glicose nas amostras, que o etanol é característico das amostras que sofreram maturação e o ácido láctico está presente no mel sem maturar.

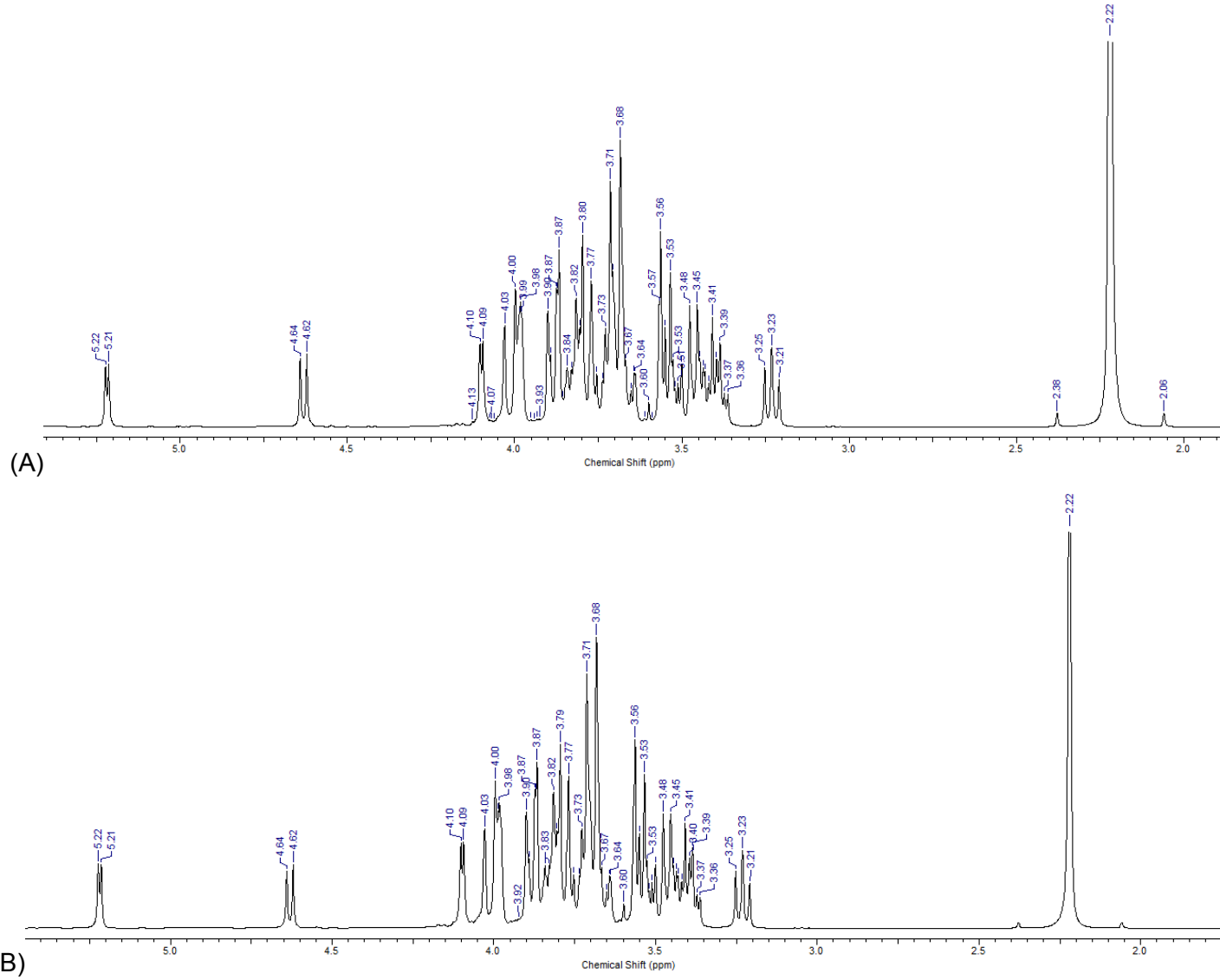
**Tabela 6** – Coeficientes de correlação para os dados da ressonância magnética nuclear.

	Etanol	Ácido Láctico	Glicose	Sacarose
Etanol	1,00	-	-	-
Ácido Láctico	<b>-0,17</b>	1,00	-	-
Glicose	0,69	0,21	1,00	-
Sacarose	0,75	0,14	<b>0,99</b>	1,00

**Valores em negrito são significativos ( $p < 0,05$ ).**

Gomes et al. (2005) utilizaram a ressonância magnética nuclear de hidrogênio para avaliar se os processos de conservação (desumidificação e pasteurização) alteravam a composição do mel da espécie Mandaçaia e verificaram nos espectros que os sinais relativos aos de hidrogênios nas moléculas de açúcares presentes nas amostras, antes e após a pasteurização eram iguais, indicando que os açúcares presentes no mel não sofreram nenhuma degradação quando exposto a este processo. Isto também foi observado neste estudo e pode ser verificado pela comparação dos espectros da amostra tempo inicial (Figura 14A) e pasteurizada (Figura 14B), onde os picos 5,21/5,22 se referem a  $\alpha$ -glicose e 4,62/4,64 a  $\beta$ -glicose, estando de acordo com apresentado na Tabela 2 para açúcares redutores. Os teores dos compostos detectados pelo RMN estão descritos no apêndice L.

Figura 14 – Espectros da ressonância magnética nuclear das amostras tempo inicial (A) e pasteurizada (B).



Na Tabela 7 estão apresentados o conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares separados pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência. Esses dados confirmam a importância da maturação usada como método de conservação, pois quanto maior a temperatura e o tempo de maturação, maiores os conteúdos de ácidos propiônico e succínico formados (Figura 15). O ácido propiônico é considerado quimicamente como um ácido fraco ( $pK_a = 4,85$ ), porém tem a capacidade de inibir o crescimento de diversos microrganismos, sendo amplamente utilizado como conservador alimentício, produzido principalmente por bactérias do gênero *Propionibacterium* (CALDERÓN, 2012). E o ácido butanodióico, conhecido como ácido succínico, é um ácido dicarboxílico produzido como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), ou como produto principal da fermentação anaeróbica por alguns microrganismos (LEE et al., 2000), principalmente leveduras. Em condições anaeróbicas a *P. acidipropionici* produz, como produto principal, o ácido propiônico pela via dos ácidos dicarboxílicos, e como subprodutos o ácido acético, o succínico e o propanol. Houve diferença entre a amostra maturada a  $30\pm 5^\circ\text{C}$  por 90 dias e a congelada por 180 dias no conteúdo de ácido acético.

Mesmo em baixas concentrações, esses ácidos formados pela maturação são capazes de atuar como conservantes, pois as concentrações utilizadas não podem exceder 0,4% para ácido propiônico e 3% para succínico (BRASIL, 1995).

**Tabela 7** – Conteúdo de ácidos orgânicos e açúcares obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência.

	<b>Congelada por 180 dias</b>	<b>Pasteurizada e Congelada por 180 dias</b>	<b>Maturada a <math>20\pm 5^\circ\text{C}</math> por 90 dias</b>	<b>Maturada a <math>20\pm 5^\circ\text{C}</math> por 180 dias</b>	<b>Maturada a <math>30\pm 5^\circ\text{C}</math> por 90 dias</b>	<b>Maturada a <math>30\pm 5^\circ\text{C}</math> por 180 dias</b>
<b>Ácidos Orgânicos (g/100g)</b>						
<b>Acético</b>	0,07±0,06 <sup>b</sup>	0,11±0,00 <sup>ab</sup>	0,11±0,00 <sup>ab</sup>	0,09±0,00 <sup>ab</sup>	0,12±0,00 <sup>a</sup>	0,08±0,00 <sup>ab</sup>
<b>Propiônico</b>	0,00±0,00 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>e</sup>	0,01±0,00 <sup>d</sup>	0,03±0,00 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>c</sup>	0,07±0,00 <sup>a</sup>
<b>Succínico</b>	0,01±0,00 <sup>e</sup>	0,00±0,00 <sup>f</sup>	0,03±0,00 <sup>d</sup>	0,06±0,00 <sup>b</sup>	0,04±0,00 <sup>c</sup>	0,09±0,00 <sup>a</sup>
<b>Açúcares (g/100g)</b>						
<b>Sacarose</b>	0,53±0,06 <sup>bc</sup>	0,43±0,04 <sup>c</sup>	0,51±0,04 <sup>bc</sup>	0,61±0,02 <sup>b</sup>	0,59±0,08 <sup>b</sup>	0,89±0,10 <sup>a</sup>
<b>Glicose</b>	28,52±2,16 <sup>ab</sup>	29,98±2,34 <sup>ab</sup>	29,13±2,37 <sup>ab</sup>	26,14±2,15 <sup>b</sup>	30,56±2,52 <sup>b</sup>	32,08±2,37 <sup>a</sup>
<b>Frutose</b>	33,05±2,46 <sup>a</sup>	35,01±2,32 <sup>a</sup>	35,27±2,02 <sup>a</sup>	35,74±2,92 <sup>a</sup>	35,74±2,25 <sup>a</sup>	37,87±2,96 <sup>a</sup>

**Média de três medidas ± Desvio Padrão; Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha, não apresentam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).**

Com relação aos açúcares (Figura 16), quanto maior tempo e temperatura de maturação, maior o teor de sacarose. O teor de glicose diferiu somente entre as amostras maturada a  $30\pm 5^\circ\text{C}$  por 180 dias e  $30\pm 5^\circ\text{C}$  por 90 dias e maturada a  $30\pm 5^\circ\text{C}$  por 180 dias e a  $20\pm 5^\circ\text{C}$  por 180 dias. Não houve diferença entre as amostras quanto ao conteúdo de frutose. Rybak-Chmielewska (2007) analisou mel de meliponíneo estabilizado a  $100^\circ\text{C}$  por 15 minutos

(enzima inativada) e mel de meliponíneo não estabilizado, ambos armazenados a 20°C por 24 semanas. O autor descreveu aumento de 4% no teor de frutose e 1,1% no teor de glicose no mel estabilizado, e aumento de 7% no teor de frutose e 8,8% no teor de glicose do mel não estabilizado. Vásquez et al. (2008) atribuem esse comportamento a dois diferentes processos: a atividade das enzimas glicosidases presentes nos méis, que catalisam a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, e transformações químicas (condensação) de monossacarídeos a dissacarídeos.

A porcentagem de sacarose das amostras analisadas variou de 0,59 a 1,01 g/100g, o que está de acordo com as normas exigidas para méis florais de *Apis mellifera*, que estabelece máximo de 6,0% (g/100g) (BRASIL, 2000). Um teor elevado desse açúcar significa, na maioria das vezes, uma colheita prematura do mel. Os teores de glicose e frutose da amostra congelada por 180 dias estão próximos aos determinados por Almeida-Muradian e Matsuda (2007) em méis de *Melipona compressipes manaoense*. Os autores encontraram valores de 28,59 e 32,04% (g/100g) de glicose e frutose, respectivamente.

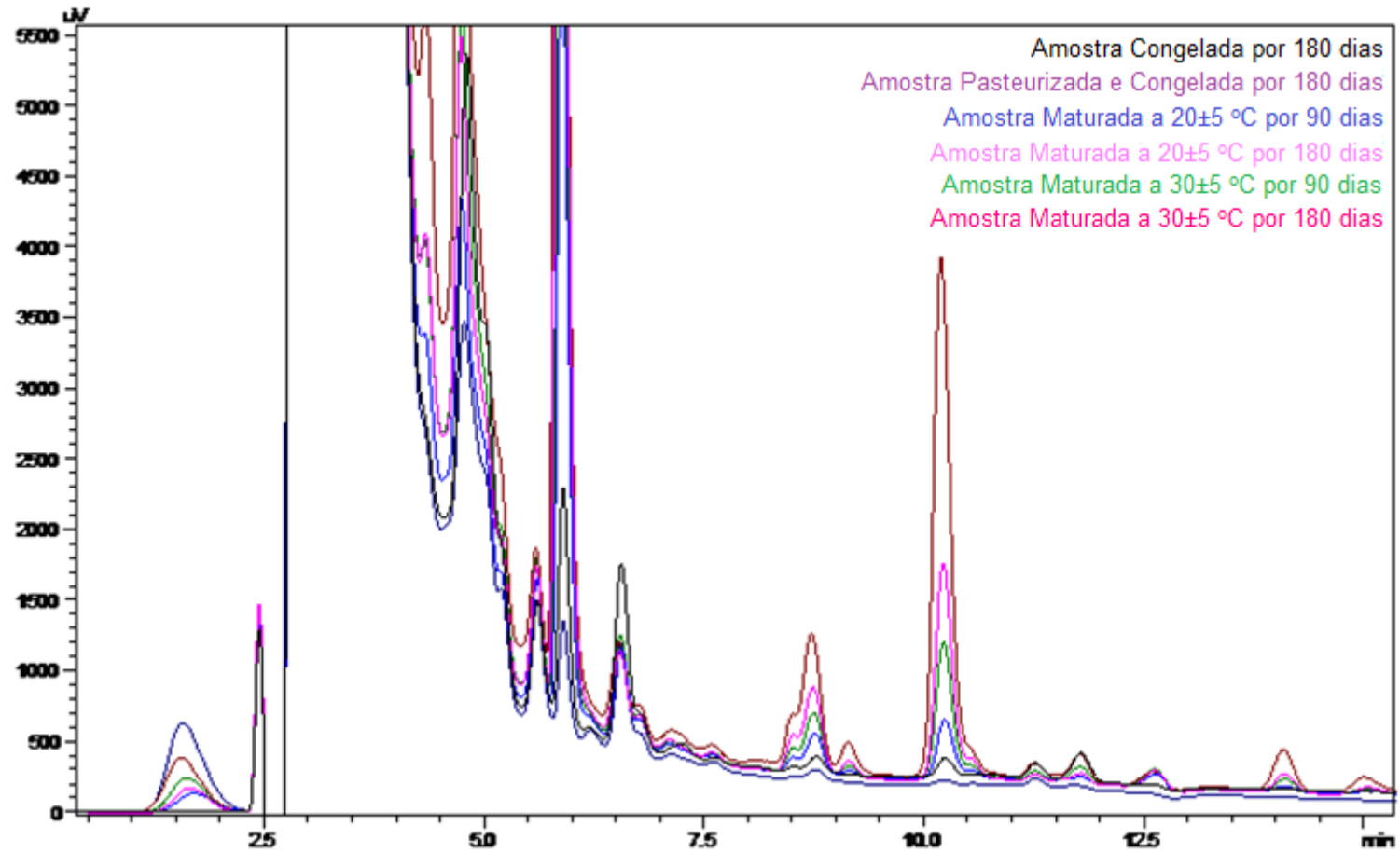
Neste trabalho os índices F/G são 0,98; 0,99; 1,03; 1,13; 0,99 e 0,99 para as amostras congelada por 180 dias, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a 20±5°C por 90 e 180 dias e maturada a 30±5°C por 90 e 180 dias, respectivamente, indicando alta tendência de cristalização conforme citado por Venir et al. (2010).

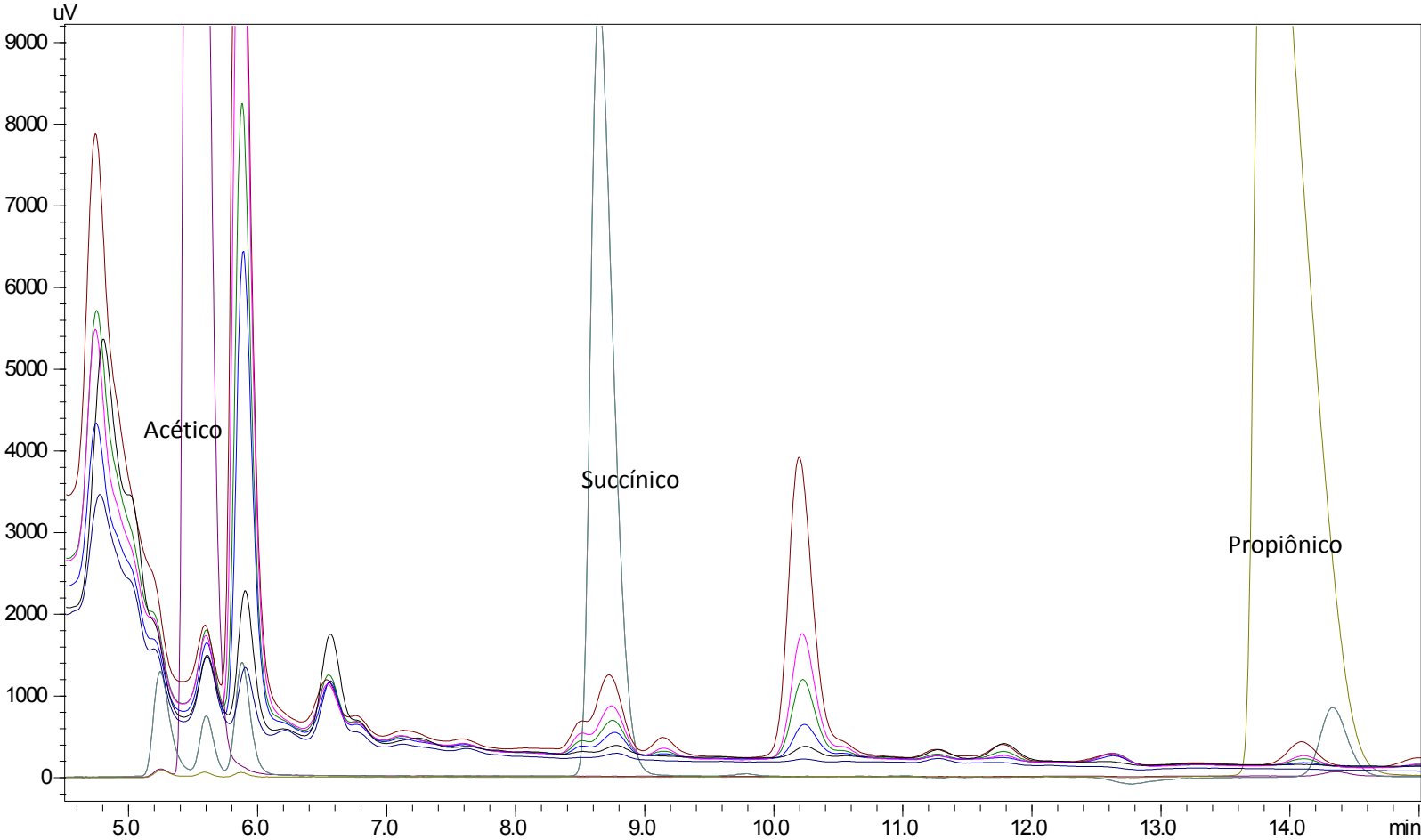
Houve uma parcial discordância entre os resultados obtidos pela técnica de ressonância magnética nuclear e cromatografia líquida de alta eficiência. Na primeira técnica foi detectada a presença de ácido láctico, que não foi observado na corrida cromatográfica. A ressonância é uma técnica que apresenta a vantagem de mostrar em um único espectro todas as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis, porém é uma técnica muito genérica já que se baseia no fato de os núcleos de determinados átomos possuírem propriedades magnéticas que podem ser utilizadas para fornecer informações químicas (GIL; GERALDES, 1987). A estrutura dos compostos analisados são muito parecidas, os picos podem ter e ser confundidos, e o resultado ser um falso-positivo. A cromatografia é uma técnica mais sensível, pois utiliza padrões de concentrações conhecidas. As duas técnicas foram coerentes na identificação e quantificação dos açúcares.

Na Figura 15B há um pico de ácido que não foi identificado por falta de padrões, mas Lengler (2004) sugere que se trata do ácido mais importante em méis, o ácido glicônico. Esse ácido é formado pela ação da enzima glicose-oxidase sobre a glicose, e representa de 70 a 90% dos ácidos orgânicos do mel, sendo o principal responsável, junto com o peróxido de hidrogênio, pela ação antibacteriana do mel. Boechat (2015) estabeleceu um procedimento para determinação de ácidos orgânicos em amostras de interesse agrônomo e ambiental utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, em coluna Rezex-ROA de exclusão iônica. O autor verificou que o tempo de retenção médio do ácido glicônico em todas

as amostras analisadas é 9,95 minutos, muito próximo ao tempo médio encontrado na presente pesquisa.

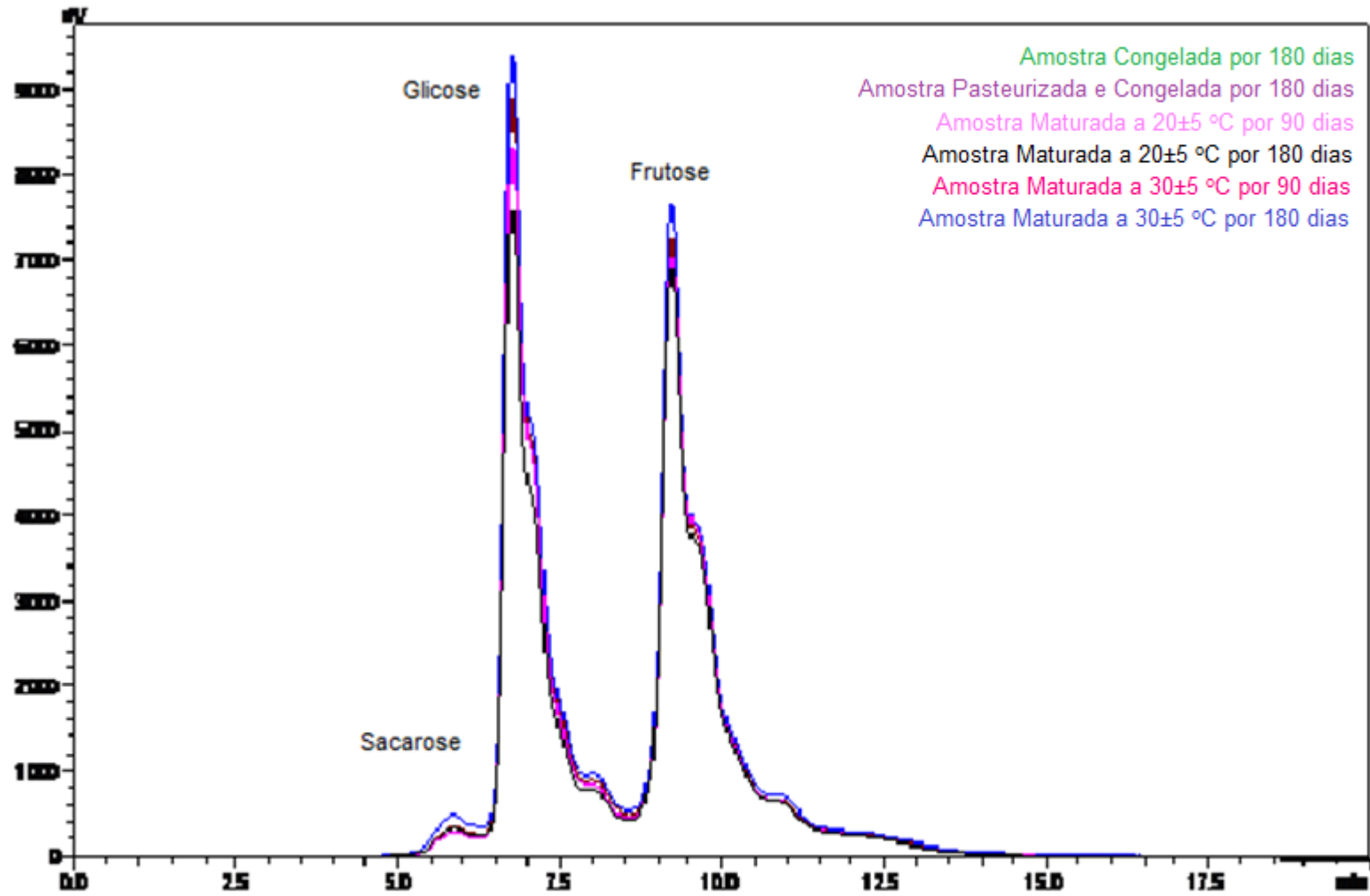
Figura 15 – Cromatograma de ácidos orgânicos (A) e zoom no cromatograma de ácidos orgânicos com picos dos padrões sobrepostos às amostras (A).





(B)

Figura 16 – Cromatograma de açúcares.

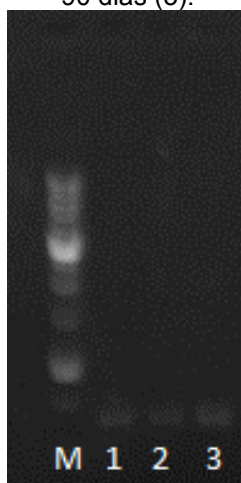


## 5.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

A possibilidade de se obter microrganismos isolados de amostras de méis de *Melipona compressipes fasciculata* possibilita o esclarecimento de etapas do processo de maturação espontânea e permite avaliar os constituintes finais do produto. E assim, contribuir com a padronização do processo, bem como estabelecer critérios que influenciariam a qualidade do produto final. Na amostra denominada congelada por 180 dias houve crescimento de colônias em todos os meios testados (YMA, MRS, MYP) na etapa de isolamento e purificação. Já na amostra 90 dias, tanto a  $20\pm 5^\circ\text{C}$  quanto a  $30\pm 5^\circ\text{C}$ , houve crescimento de colônias somente no meio YMA, característico para seleção de leveduras. Na amostra 180 dias a  $20\pm 5^\circ\text{C}$ , houve crescimento somente de colônias no meio MRS, e a  $30\pm 5^\circ\text{C}$ , desenvolvimento em ambos os meios, MRS e MYP. Na amostra pasteurizada não houve crescimento de nenhum tipo de microrganismo indicando eficiência do processo. Esses dados sugerem que a maturação no mel se inicia com uma cultura mista espontânea e que ao decorrer do tempo (90 dias), prevalece a fermentação anaeróbia, com produção de etanol e gás carbônico. Ao fim da maturação, há predominância de bactérias.

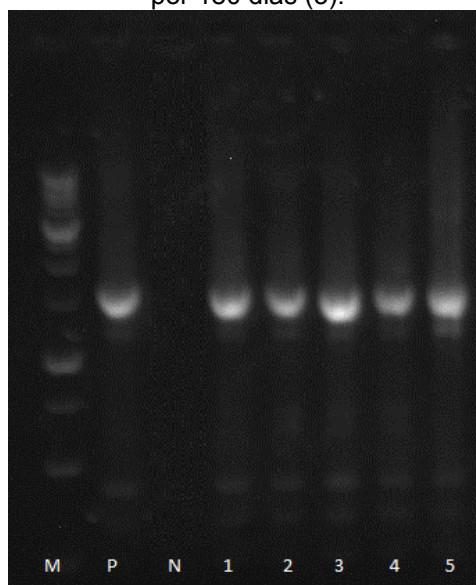
As colônias devidamente isoladas e purificadas seguiram para extração do DNA, identificação molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S. Esse sequenciamento tem sido extensivamente usado com a finalidade taxonômica e filogenética e é considerado o método de referência para a identificação microbiana. Na PCR, as amostras características de leveduras, isoladas no meio YMA, apresentaram frações (*amplicons*) de aproximadamente 450 pares de bases (Figura 17). Já para as amostras características de bactérias, isoladas nos meios MRS e MYP, apresentaram frações (*amplicons*) de aproximadamente 1200 pares de bases (Figura 18).

**Figura 17** – Gel representativo dos fragmentos amplificados da região ITS-1 e ITS-4 das amostras isoladas do mel congelado por 180 dias (1), maturado a  $20\pm 5^\circ\text{C}$  por 90 dias (2) e maturado a  $30\pm 5^\circ\text{C}$  por 90 dias (3).



M=marcador de 100pb DNA

**Figura 18** – Gel representativo dos fragmentos amplificados da região FD1 e RD1 das amostras isoladas no meio MYP do mel congelado por 180 dias (1) e maturado a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias (2) e isoladas do meio MRS do mel congelado por 180 dias (3), maturado a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias (4) e maturado a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$  por 180 dias (5).



**M=marcador de 100pb DNA; P=controle positivo; N=controle negativo**

O tamanho das bandas encontradas foi próximo às determinadas por Pereira (2010) e Castro et al. (2011), que identificaram molecularmente *C. lusitaniae* e *E. coli* e encontraram 420 e 1200 pares de base, respectivamente, utilizando os mesmos iniciadores.

A amplificação específica foi confirmada por sequenciamento do fragmento amplificado. O produto foi comparado com sequências depositadas no banco de dados do *Genbank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), indicando as respectivas identidades, *e-value* e coberturas demonstradas na Tabela 8.

**Tabela 8** – Valores de cobertura, *E-value* e identidade obtidos em comparação ao banco de dados.

Amostra	Descrição	Cobertura	<i>E-value</i>	Identidade
Congelada por 180 dias <sup>1</sup>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	98%	0	99%
Maturada a $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 90 dias <sup>1</sup>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	96%	0	96%
Maturada a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 90 dias <sup>1</sup>	<i>Meyerozyma caribbica</i>	98%	0	98%
Congelada por 180 dias <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i>	64%	0	87%
Maturada a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 180 dias <sup>2</sup>	<i>Escherichia coli</i>	67%	0	86%
Tempo inicial <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i>	64%	0	89%
Maturada a $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 180 dias <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i>	74%	0	96%

Maturada a 30±5°C por 180 dias <sup>3</sup>	<i>Escherichia coli</i>	75%	0	94%
---	-------------------------	-----	---	-----

<sup>1</sup> Amostras isoladas no meio YMA; <sup>2</sup> Amostras isoladas no meio MYP; <sup>3</sup> Amostras isoladas no meio MRS

A cobertura representa a porcentagem da sequência submetida ao programa e que é coberta pelo alinhamento (EMBRAPA, 2007). O *E-value* representa o valor estatístico que indica se o alinhamento é real ou foi obtido meramente pelo acaso (falso-positivo) no banco de dados, então quanto menor seu valor, maior a confiabilidade da predição (mais significativo o alinhamento). A identidade representa o número de resíduos de bases similares identificados no alinhamento e expresso, em porcentagem, a partir da comparação com o comprimento deste alinhamento. Sendo assim, os resultados do sequenciamento são confiáveis e mostram que alguns dos microrganismos presentes nas amostras estudadas são *Meyerozyma caribbica* e *Escherichia coli*. O estudo de Snowdon (1999) apresenta como microbiota do mel bactérias do gênero *Bacillus*, e fungos dos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Saccharomyces*.

De acordo com o UniProt (*Universal Protein Resource* - <http://www.uniprot.org/taxonomy/>), *Pichia caribbica* é sinônimo de *Candida fermentati* e *Meyerozyma caribbica*, descrita como o estado ascósporo, estrutura de reprodução de fungos da classe ascomicetos, de *Candida fermentati* (OHARA, 2014). A *Pichia caribbica* já foi isolada de água e classificada como pertencente ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales, família Saccharomycetaceae e gênero *Pichia* (BARNETT et al. 2002). A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, anaeróbia facultativa pertencente à Família *Enterobacteriaceae* (SANTOS et al., 2009). Aceita-se que a *E.coli* possua essencialmente quatro vias metabólicas, sendo as principais a fermentação da glicose, com produção essencialmente de etanol, acetato, formato, succinato e lactato e a oxidação da glicose, com produção de dióxido de carbono (CARVALHO, 2009).

Silva et al. (2008) mencionaram que as características microbiológicas do mel estão relacionadas à qualidade e a segurança deste alimento, sendo os microrganismos de maior importância as leveduras, fungos filamentosos e bactérias formadoras de esporos. Estes microrganismos podem estar envolvidos em atividades de deterioração do produto, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica, produção de fatores do crescimento (vitaminas e aminoácidos) e fatores de inibição de microrganismos competidores.

A maioria dos autores estuda a microbiota do mel apenas com a finalidade de verificar a qualidade microbiológica. Souza et al. (2009) avaliaram a qualidade microbiológica do mel produzido por espécies de abelhas sem ferrão (Trigonini), do Estado da Bahia e verificaram que metade das amostras analisadas apresentou contagem padrão de bolores e leveduras acima do máximo previsto na regulamentação brasileira para alimentos. Oliveira et al. (2005) avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de mel de abelhas sem ferrão

submetido a diferentes métodos de colheita, método do produtor e método asséptico, e verificaram que, apesar de em nenhum dos dois métodos ter sido verificada a presença de microrganismos do grupo coliforme, a contagem de bolores e leveduras em 65% das amostras colhidas pelos produtores estava acima do máximo estabelecido pelas normas brasileiras, contra 25% das colhidas assepticamente.

A presença de leveduras osmofílicas é geralmente citada como presente no mel, em maior ou menor quantidade, as quais podem levar o produto a fermentar, implicando na hidrólise de açúcares com produção de álcool e gás carbônico (WHITE JÚNIOR, 1978). Sua origem geralmente é de ocorrência natural, associada às abelhas e representam uma microbiota não patogênica, sendo muitas ainda não identificadas (GILLIAM, 1997).

### 5.3 ANÁLISE SENSORIAL

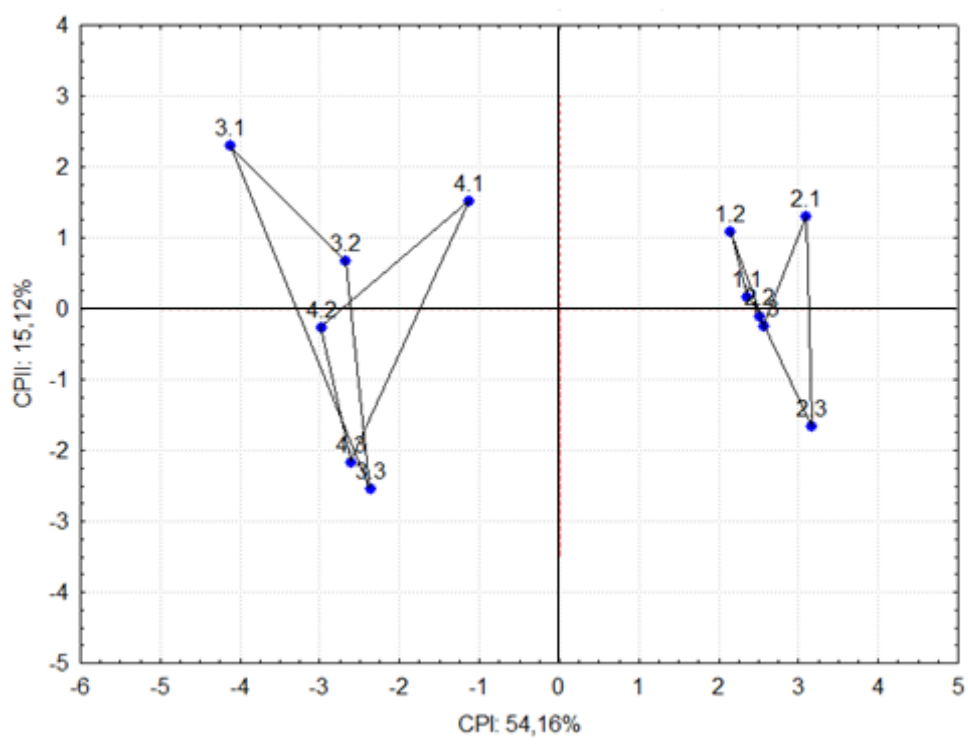
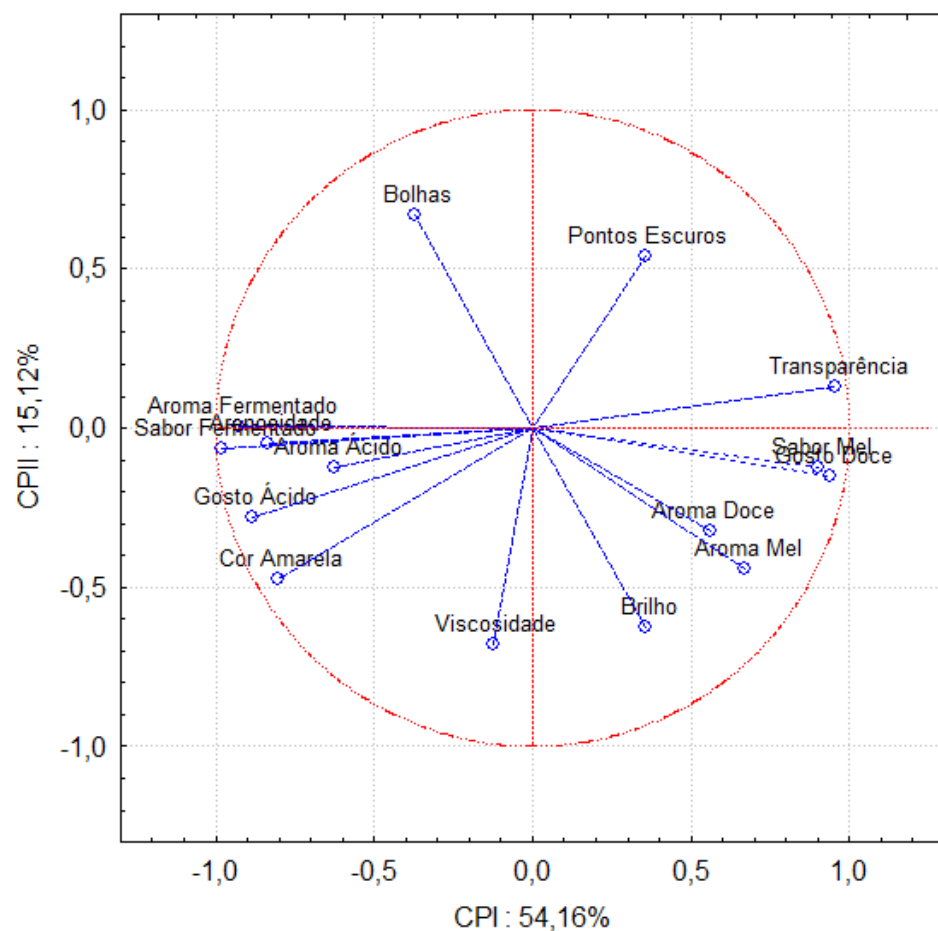
#### 5.3.1 Análise Descritiva Quantitativa

Os dados obtidos da análise sensorial descritiva dos méis dos quatro tratamentos (descritos no item 4.2.1) foram submetidos à análise de componentes principais, que permite visualizar as relações entre as amostras e os atributos que melhor caracterizam cada uma (Figuras 19 e 20). O primeiro componente principal (CPI) explicou 54,16% da variação total das variáveis originais, o segundo componente (CPII) explicou 15,12%, e o terceiro (CPIII), 10,20%, totalizando 79,48% de explicação.

No primeiro componente (Figura 19A) os atributos que apresentaram correlação ( $r$ ) superior a  $\pm 0,65$  contribuíram mais com sua explicação e foram aroma de mel ( $r = +0,66$ ), sabor de mel ( $r = +0,90$ ), gosto doce ( $r = +0,93$ ), transparência ( $r = +0,95$ ), cor amarela ( $r = -0,80$ ), arenosidade ( $r = -0,83$ ), gosto ácido ( $r = -0,88$ ), aroma fermentado ( $r = -0,92$ ) e sabor fermentado ( $r = -0,98$ ). No segundo componente, os atributos importantes foram bolhas ( $r = +0,66$ ) e viscosidade ( $r = -0,67$ ), e no terceiro, pontos escuros ( $r = +0,67$ ) (Figura 20A).

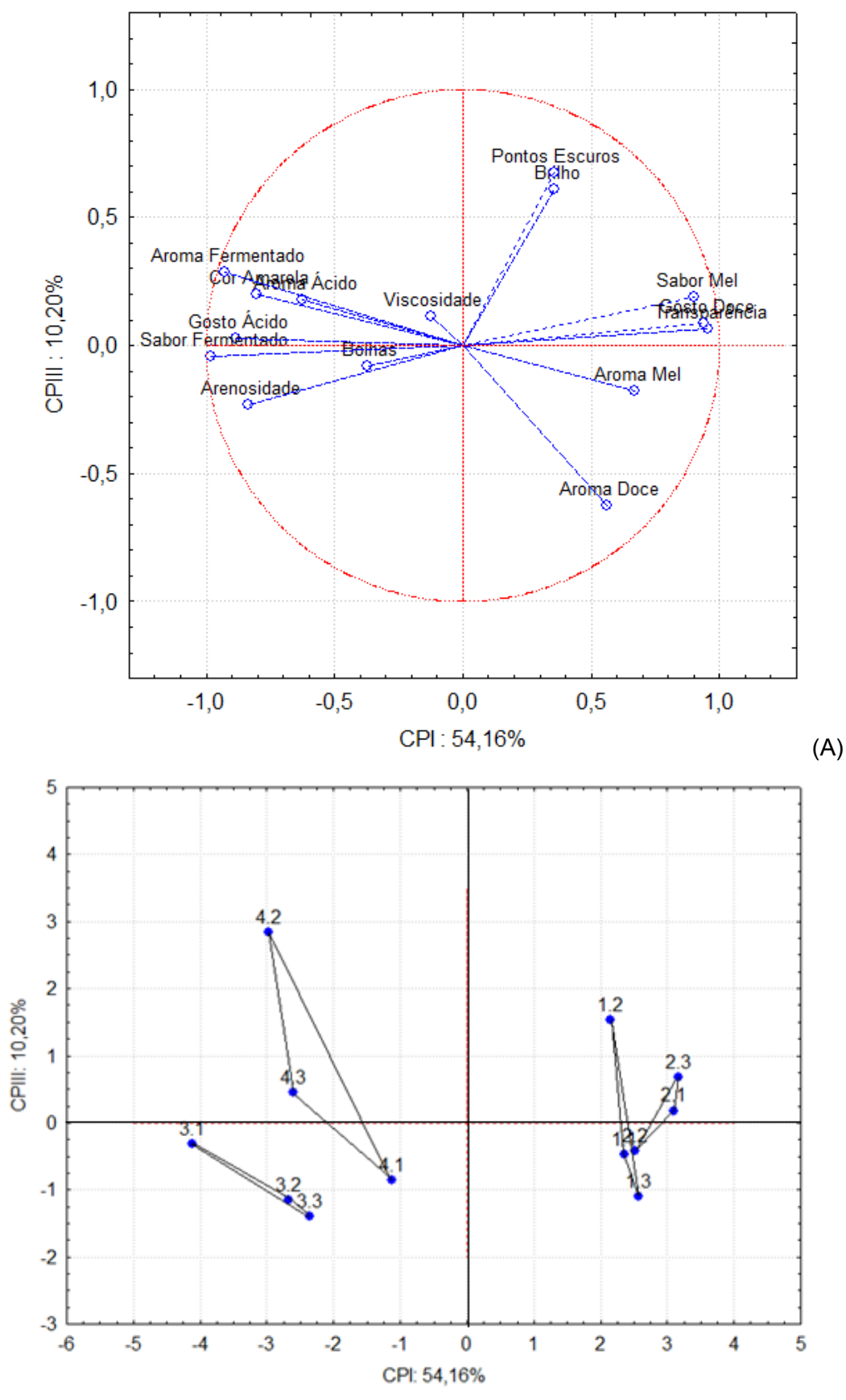
Em relação ao CPI as amostras maturadas foram separadas das não maturadas (Figuras 19B e 20B). As maturadas, à esquerda, foram caracterizadas pela cor amarela, arenosidade, gosto ácido, aroma e sabor fermentado. À direita localizaram-se as não maturadas, caracterizadas pelo aroma e sabor de mel, gosto doce e transparência.

**Figura 19** – Projeções dos atributos sensoriais (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPPII).



1: Amostra Congelada, 2: Amostra Pasteurizada e Congelada por 180 dias, 3: Amostra Maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , 4: Amostra Maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Nas amostras o segundo dígito indica a repetição da análise.

**Figura 20** – Projeções dos atributos sensoriais (A) e amostras de mel (B) sobre o plano fatorial (CPIxCPIII).



1: Amostra Congelada por 180 dias, 2: Amostra Pasteurizada e Congelada por 180 dias, 3: Amostra Maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ , 4: Amostra Maturada a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Nas amostras o segundo dígito indica a repetição da análise.

Os coeficientes de correlação entre os atributos estão indicados na Tabela 9. O atributo cor amarela apresentou correlação positiva e significativa com os atributos aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade e correlação negativa e significativa com os atributos transparência, pontos escuros, aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel, sugerindo que a mudança de cor está diretamente relacionada com o processo de maturação. O atributo brilho teve correlação positiva e significativa com os atributos transparência, aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel, e correlação negativa e significativa com os atributos bolhas, aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, indicando que o brilho é perdido durante a maturação. O atributo transparência teve correlação positiva e significativa com os atributos pontos escuros, aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel e correlação negativa e significativa com os atributos bolhas, aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, indicando também que a transparência é desfavorecida durante a maturação.

O atributo bolhas teve correlação positiva e significativa com os atributos aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade e correlação negativa e significativa com os atributos aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel, sugerindo que as bolhas são formadas durante o processo de maturação, assim como os atributos aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido e sabor fermentado que apresentam correlação positiva e significativa com os atributos aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, sabor fermentado e arenosidade e arenosidade, respectivamente.

Esses dados também apontam que os atributos pontos escuros, aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel são característicos das amostras sem maturar e inversamente proporcionais ao processo de maturação pois apresentam correlação negativa e significativa com os atributos aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado, viscosidade e arenosidade, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, gosto ácido, sabor fermentado e arenosidade, sabor fermentado e arenosidade e arenosidade, respectivamente.

Tabela 9 – Coeficientes de correlação entre os atributos sensoriais.

	Cor Amarela	Brilho	Transparência	Bolhas	Pontos Escuros	Aroma Ácido	Aroma Doce	Aroma Fermentado	Aroma Mel	Gosto Ácido	Gosto Doce	Sabor Fermentado	Sabor Mel	Viscosidade	Arenosidade
Cor Amarela	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brilho	0,15	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Transparência	<b>-0,78</b>	<b>0,31</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bolhas	-0,14	<b>-0,58</b>	<b>-0,31</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pontos Escuros	<b>-0,43</b>	0,15	<b>0,42</b>	0,19	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aroma Ácido	<b>0,51</b>	<b>-0,02</b>	<b>-0,54</b>	<b>0,42</b>	<b>-0,09</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aroma Doce	<b>-0,36</b>	<b>0,06</b>	<b>0,49</b>	<b>-0,36</b>	-0,35	<b>-0,23</b>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Aroma Fermentado	<b>0,84</b>	<b>-0,13</b>	<b>-0,84</b>	<b>0,32</b>	<b>-0,14</b>	<b>0,67</b>	<b>-0,61</b>	1	-	-	-	-	-	-	-
Aroma Mel	<b>-0,42</b>	<b>0,38</b>	<b>0,52</b>	<b>-0,32</b>	0,01	<b>-0,17</b>	<b>0,66</b>	<b>-0,68</b>	1	-	-	-	-	-	-
Gosto Ácido	<b>0,87</b>	<b>-0,17</b>	<b>-0,81</b>	<b>0,11</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,67</b>	<b>-0,4</b>	<b>0,82</b>	<b>-0,41</b>	1	-	-	-	-	-
Gosto Doce	<b>-0,69</b>	<b>0,46</b>	<b>0,89</b>	<b>-0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>-0,47</b>	<b>0,53</b>	<b>-0,85</b>	<b>0,64</b>	<b>-0,77</b>	1	-	-	-	-
Sabor Fermentado	<b>0,84</b>	<b>-0,32</b>	<b>-0,93</b>	<b>0,22</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,53</b>	<b>-0,48</b>	<b>0,9</b>	<b>-0,67</b>	<b>0,88</b>	<b>-0,91</b>	1	-	-	-
Sabor Mel	<b>-0,66</b>	<b>0,49</b>	<b>0,82</b>	<b>-0,28</b>	<b>0,34</b>	<b>-0,5</b>	<b>0,36</b>	<b>-0,77</b>	<b>0,67</b>	<b>-0,79</b>	<b>0,86</b>	<b>-0,92</b>	1	-	-
Viscosidade	0,27	0,32	-0,3	-0,15	<b>-0,28</b>	0,2	-0,09	0,04	0,26	0,23	0,06	0,07	0,14	1	-
Arenosidade	<b>0,53</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,92</b>	<b>0,46</b>	<b>-0,45</b>	<b>0,45</b>	<b>-0,42</b>	<b>0,63</b>	<b>-0,4</b>	<b>0,65</b>	<b>-0,7</b>	<b>0,78</b>	<b>-0,71</b>	0,37	1

Valores em negrito são significativos ( $p < 0,05$ ).

As intensidades de cada atributo estão apresentadas na Tabela 10.

**Tabela 10** – Intensidade média de atributos sensoriais de amostras de mel congelada, pasteurizada, maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  e a  $30\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

		Congelada por 180 dias	Pasteurizada e Congelada por 180 dias	Maturada a $20\pm 5^{\circ}\text{C}$	Maturada a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$	
Aparência	Cor Amarela	3,47 <sup>bc</sup>	3,43 <sup>c</sup>	4,02 <sup>ab</sup>	4,28 <sup>a</sup>	
	Brilho	6,71 <sup>a</sup>	6,81 <sup>a</sup>	6,44 <sup>a</sup>	6,67 <sup>a</sup>	
	Transparência	6,40 <sup>a</sup>	6,43 <sup>a</sup>	4,46 <sup>c</sup>	5,12 <sup>b</sup>	
	Bolhas	0,65 <sup>a</sup>	0,67 <sup>a</sup>	1,36 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	
	Pontos Escuros	0,77 <sup>a</sup>	0,63 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a</sup>	0,58 <sup>a</sup>	
Atributos	Aroma	Ácido	3,28 <sup>a</sup>	3,26 <sup>a</sup>	3,72 <sup>a</sup>	3,50 <sup>a</sup>
		Doce	4,29 <sup>a</sup>	4,23 <sup>a</sup>	4,10 <sup>a</sup>	3,92 <sup>a</sup>
		Fermentado	3,03 <sup>b</sup>	2,99 <sup>b</sup>	4,43 <sup>a</sup>	4,61 <sup>a</sup>
		Mel	4,67 <sup>a</sup>	4,69 <sup>a</sup>	4,42 <sup>a</sup>	4,23 <sup>a</sup>
Sabor	Gosto Ácido	3,23 <sup>b</sup>	2,97 <sup>b</sup>	4,10 <sup>a</sup>	4,31 <sup>a</sup>	
	Gosto Doce	5,93 <sup>a</sup>	5,91 <sup>a</sup>	5,01 <sup>b</sup>	4,85 <sup>b</sup>	
	Fermentado	3,06 <sup>b</sup>	2,68 <sup>b</sup>	5,05 <sup>a</sup>	4,92 <sup>a</sup>	
	Mel	5,25 <sup>b</sup>	5,62 <sup>a</sup>	4,69 <sup>c</sup>	4,83 <sup>c</sup>	
Textura	Viscosidade	2,80 <sup>a</sup>	2,94 <sup>a</sup>	2,98 <sup>a</sup>	2,88 <sup>a</sup>	
	Arenosidade	0,04 <sup>b</sup>	0,07 <sup>b</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,94 <sup>b</sup>	

**Médias, na mesma linha, acompanhadas de letras iguais não diferem a  $p < 0,05$  pelo teste de Duncan ajustado. Escala de Intensidade de 9 cm. Valores médios de 13 provadores.**

Houve diferença entre as amostras em relação aos atributos cor amarela, transparência, aroma fermentado, gosto ácido, gosto doce, sabor fermentado, sabor de mel e arenosidade. As amostras congelada e pasteurizada apresentaram maior transparência e gosto doce e conseqüentemente menos gosto ácido, sabor e aroma fermentado, justamente por terem tido o processo de maturação espontânea interrompido. Já a amostra maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  apresentou maior arenosidade, devido à cristalização dos açúcares. Isto confirma a tendência de cristalização sugerida por Venir et al. (2010) pela razão entre frutose e glicose, no qual a amostra maturada a  $20\pm 5^{\circ}\text{C}$  apresentou maior índice. Considerando que a cristalização da glicose sofre influência da temperatura e pureza da solução e que ambas as amostras (maturação 1 e 2) antes de serem maturadas foram provenientes de uma mesma colheita, a presença de cristais de açúcares na amostra maturada em temperatura inferiores pode ser atribuída à diminuição da solubilidade do açúcar com a diminuição da temperatura, induzindo a

supersaturação, nucleação e conseqüente formação dos cristais (MANTELATTO, 2005). A maturação em ambas as temperaturas permitiu intensificar a cor amarela e sabor e aroma fermentado e diminuir a transparência e gosto doce. A amostra pasteurizada foi a que apresentou maior sabor de mel. Não houve diferença entre as amostras quanto aos atributos brilho, bolhas, pontos escuros, aroma ácido, aroma doce, aroma de mel e viscosidade.

A avaliação por método físico indicou que a amostra recém pasteurizada possuía viscosidade semelhante à do tempo inicial e superior às congeladas e maturadas (1 e 2). Porém, na avaliação sensorial (onde não foram avaliadas amostras do tempo inicial e recém pasteurizada e sim a pasteurizada e posteriormente congelada por 180 dias) não houve diferença entre as amostras (congelada, pasteurizada e congelada e as maturadas 1 e 2). Este resultado confirma que o congelamento ocasionou a redução da viscosidade do mel.

Alves et al. (2005) descreveram o perfil sensorial de méis silvestres de vários municípios do estado de Alagoas utilizando Análise Descritiva Quantitativa. Os seguintes atributos foram estabelecidos: a) aromas característico, doce, ácido, cera, floral, frutal, caramelizado e refrescante; b) viscosidade e pegajoso; c) sabores característico, melado de cana, cera, floral, frutal, queimado, verde; d) gostos doce, ácido, amargo; e e) sensação bucal: refrescante, adstringente. Barros et al. (2013) também descreveu o perfil sensorial de méis de *Apis* por Análise Descritiva Quantitativa e os atributos que mais se destacaram foram viscosidade, aroma ácido, sabor floral e gosto ácido. Ferreira et al. (2016) desenvolveram vocabulário para estabelecer critério de qualidade de méis de abelhas sem ferrão. Os autores utilizaram a técnica do Perfil Livre e os atributos que melhor descreveram as amostras foram: viscosidade, cor amarela, transparência, cor de caramelo, gosto doce, gosto ácido, sabor alcoólico, sabor residual, adstringente, aroma doce, aroma ácido, aroma floral, aroma de mel. Os atributos levantados por estes autores foram semelhantes com os deste trabalho, principalmente em relação ao aroma, ácido e doce, e viscosidade.

Sodré et al. (2008) avaliando o perfil sensorial de méis de *Melipona scutellaris* e *M. quadrifasciata* submetidos à pasteurização e desumidificação verificaram que os atributos que melhor caracterizaram as amostras foram cristalização, sabor, aroma, cor e fluidez, e assim como neste trabalho, as amostras tratadas termicamente apresentaram maior tendência a cristalização, e sabor e aroma ácidos mais intensos.

### 5.3.2 Teste de Aceitação

As notas de aceitação em todos os atributos avaliados foram superiores a 6,0 (em escala de 10 cm) para todas as amostras, indicando a aprovação (Tabela 11). Ferreira et al. (2008) empregando escala de 9 pontos (1= desgostei extremamente e 9= gostei extremamente), também observaram aceitação superior ao ponto central da escala (5) para

méis de abelhas indígenas de diferentes regiões do Brasil. As médias de aceitabilidade foram maiores que as encontradas por Sodré et al. (2008) em méis de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata*, 5,04 e 5,31 em escala de 10 pontos.

Notou-se que não houve diferença significativa entre as amostras quanto à aceitação do atributo aroma. Em relação à aparência, sabor, textura e aceitação global as amostras congelada e pasteurizada e congelada por 180 dias apresentaram as maiores médias.

**Tabela 11** – Intensidade média de atributos sensoriais de amostras de mel congelada, pasteurizada e congelada por 180 dias, maturada a 20±5°C e a 30±5°C.

	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Aceitação Global
<b>Congelada por 180 dias</b>	7,33±1,86 <sup>a</sup>	6,72±2,23 <sup>a</sup>	8,09±1,96 <sup>a</sup>	7,71±1,99 <sup>a</sup>	7,89±1,70 <sup>a</sup>
<b>Pasteurizada e Congelada por 180 dias</b>	7,14±1,93 <sup>a</sup>	6,37±2,40 <sup>a</sup>	7,58±2,12 <sup>a</sup>	7,37±2,06 <sup>a</sup>	7,44±1,70 <sup>a</sup>
<b>Maturada a 20±5°C</b>	6,05±2,22 <sup>b</sup>	6,16±2,33 <sup>a</sup>	6,44±2,69 <sup>b</sup>	6,54±2,18 <sup>b</sup>	6,57±2,42 <sup>b</sup>
<b>Maturada a 30±5°C</b>	6,17±2,25 <sup>b</sup>	6,29±2,19 <sup>a</sup>	6,38±2,39 <sup>b</sup>	6,43±2,29 <sup>b</sup>	6,49±2,25 <sup>b</sup>

**Média ± Desvio padrão; Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna, não apresentam diferença significativa pelo Teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ).**

Chama atenção a diminuição da nota em relação ao sabor com a diminuição da doçura do produto (Tabela 9). Resultados semelhantes já foram encontrados em outros alimentos como café e néctar de uva (PRADO et al., 2011; PONTES et al., 2010). No mel de abelhas indígenas, Ferreira et al. (2008) também concluiu que os consumidores preferem mel mais doce e menos ácido. Essa preferência por produtos mais doces também fez com que a aceitação global das amostras de mel maturadas fosse inferior, porém ainda com médias acima de 6.

## 6 CONCLUSÃO

O congelamento ocasiona redução da viscosidade e umidade e a pasteurização leva à redução do pH do mel de tiúba. O mel sofre maturação natural por fermentação ácida e alcoólica quando armazenado por 180 dias tanto em temperatura de 20°C como a 30°C. Os microrganismos isolados e identificados foram *Escherichia coli* e *Candida fermentati*. Os atributos que melhor descrevem as amostras sem maturar (congelada e pasteurizada) são pontos escuros, aroma doce, aroma de mel, gosto doce e sabor de mel e os que descrevem as maturadas são aroma ácido, aroma fermentado, gosto ácido, sabor fermentado, viscosidade e arenosidade. O mel de *Melipona Compressipes Fasciculata* conservado por congelamento, pasteurização e maturação a 20°C e 30°C são aprovados e aceitos pelos consumidores.

## REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas. **Especialização de cores de acordo com o sistema de notação Munsell – NBR 12694**. Rio de Janeiro, nov. 1992.

ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo de; MATSUDA, Adriana Hitomi. Physicochemical parameters of amazon melípona honey. **Quim. Nova**, v. 30, n.3, p. 707-708, 2007.

ALVES, M. A. M. et al. Desenvolvimento do Perfil Sensorial de Méis Silvestres (*Apis mellifera*) de Vários Municípios do Estado de Alagoas. **Comunicado Técnico CTAA**, 2005.

ALVES, T. et al. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do nordeste brasileiro. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 91–97, 2011.

AMARAL, Daniela Almeida do; PEREIRA, Maria Letícia de Souza; FERREIRA, Cláudia Colamarco; GREGÓRIO, Eric Liberato. Análise sensorial de geleia de polpa e de casca de maracujá. **HU Revista**, v. 38, n. 3 e 4, p. 181-186, jul./dez. 2012.

ANACLETO, D. D. A. et al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 535–541, 2009.

AOAC. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. 19 ed. Arlington, 2012.

ARAÚJO J. M. A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. Imprensa Universitária, Viçosa, UFV, 335p., 1995.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUZA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel caracterizado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 1, p. 51-56, 2006.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteritics and Identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1002 p., 2002.

BARROS, Lais Buriti de; CRUZ, A. G.; JUNIOR, Carlos Adam Conte; MÁRSICO, E.T.; FREITAS, Mônica Queiroz. **Perfil Sensorial e de Qualidade do Mel (*Apis mellifera*) Produzido em Nova Friburgo, Rio de Janeiro**. Disponível em: <[https://proceedings.galoa.com.br/slaca/slaca-2013/trabalhos/perfil\\_sensorial\\_e\\_de\\_qualidade\\_do\\_mel\\_apis\\_mellifera\\_produzido\\_em\\_nova\\_friburgo\\_rio\\_de\\_janeiro](https://proceedings.galoa.com.br/slaca/slaca-2013/trabalhos/perfil_sensorial_e_de_qualidade_do_mel_apis_mellifera_produzido_em_nova_friburgo_rio_de_janeiro)>. Acesso em: 27 set. 2016.

BARTH, Monika O.; MAIORINO, Camila; BENATTI, Ana P.T.; BASTOS, Deborah H. M. Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados monoflorais do sudeste do brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 229-233, abr.-jun. 2005.

BEDFORD, M. R., SHULZE, H.. Exogenous enzymes for pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews** v. 11, p. 91-114, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 out. 2000.

BRASIL. Relativa aos aditivos alimentares com exceção dos corantes e dos edulcorantes. Diretiva 95/2/CE. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20 fev. 1995.

BOECHAT, Isaac Lima Poubel. **Análise de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência em amostras de interesse agrônomo e ambiental**. Monografia (Conclusão de Curso) - Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2015.

CALDERÓN, Luige Armando Llerena. **Estudo de otimização das condições da Fermentação para produção de ácido propiônico por propionibacterium acidipropionici utilizando xarope de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CAMARGO, J.M.F. **Biogeografia de Meliponini (HYMENOPTERA, APIDAE, APINAE): a fauna amazônica**. In: Encontro sobre Abelhas, I, Ribeirão Preto. Anais do I o Encontro Sobre Abelhas, Ribeirão Preto, F.F.C.L.R.P., USP. v. 1, p. 46-59, 1994.

CARVALHO, C. A L. et al. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 143–149, 2009.

CARVALHO, C. A. L. DE et al. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização. **Série Meliponicultura**, n. 4, p. 32, 2005.

CARVALHO, Sandra Maria Gomes. **Monitorização e Modelação da Fermentação de E. coli Recombinante**. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Portugal, 2009.

CASTRO, B.G.; SOUZA, M.M.S.; MANGIA, A.H. Régua; BITTENCOURT, A.J.. Caracterização genotípica de amostras Escherichia coli isoladas de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.2, p.515-517, 2011.

CAVALCANTE, S. M. P. **Características físico-químicas de méis de Meliponascutellaris de diferentes municípios do Estado da Bahia**. In Congresso Brasileiro de Apicultura, 16, 2006. Anais... Aracajú: Confederação Brasileira de Apicultura, 2006.

CHAPMAN, K. W.; LAWLESS, H. T.; BOOR, K. J. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of ultrapasteurized milk. **J. Dairy Sci.** 84:12–20, 2001.

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

DAMÁSIO, M. H; COSTELL, E. Analisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. **Revista Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 31, n. 2, p. 165-178, 1991.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de Alimentos de Fennema.** Tradução Adriano Brandelli, 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

EMBRAPA. **Comunicado Técnico 86:** Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. 2013.

EMBRAPA. **O programa BLAST:** guia prático de utilização. 2007.

ESCRIVÁ, M. Victória Gilabert et al. Comparação das propriedades reológicas da massa de cacau torrada convencionalmente e por microondas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 2, 1998.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterizations of honey from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1649-1653, 2007.

FERREIRA, E.L.; LEONCINI, C.; BENASSI, M. T.; BARTH, O.M.; BASTOS, D. H. M. Avaliação sensorial de mel de abelhas indígenas de diferentes localidade do Brasil. **Mensagem Doce**, v. 93, p. 16-24, 2008.

FERREIRA, E.L.; LEONCINI, C.; BENASSI, M. T.; BARTH, O.M.; BASTOS, D. H. M. Descriptive Sensory Analysis and Acceptance of Stingless Bee Honey. **Food Sci Tech Int**, v. 15, n.3, 2016.

FREITAS, W. et al. Parâmetros físico-químicos do mel de abelha sem ferrão (*Melipona Subnitida*) após tratamento termico. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.3, p.153-157, 2010.

GARDES, M; BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 113-118, 1993.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiology Letter**, v. 155, n. 1, p. 1-10, 1997.

GIL, V.M.S.; GERALDES, C.F.G.C. **Ressonância Magnética Nuclear**: Fundamentos, métodos e aplicações. Coimbra : Fundação Calouste Gulbenkian, 1987. 1012p.

GOMES, Diego F. et al. **Avaliação de Méis produzidos por de Abelhas Sem Ferrão, utilizando a Técnica de RMN de <sup>1</sup>H**. Faculdade de Jaguariuna, 2005.

GOMES, M. D. **Síntese de poliésteres a partir do ácido 2,5 furanodicarboxílico**. Dissertação (Mestrado), Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2009.

HOLANDA, Carlos Alexandre; OLIVEIRA, Alene Ramos; COSTA, Maria Célia Pires; RIBEIRO, Maria Nilce de Sousa; SOUZA, Janilson Lima; ARAÚJO, Maria José Abigail Mendes. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do cerrado maranhense. **Quím. Nova**, v.35, n.1, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**, v. 40, 2012. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\_Pecuaria/Producao\_da\_Pecuaria\_Municipal/2012/ppm2012.pdf >. Acesso em: 13 nov. 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. São Paulo, 2008.

JOLLIFFE, I.T. **Principal component analysis**. 2.ed. New York: Springer-Verlag, 2002. 488p. (Springer series in statistics). DOI:10.1007/b98835.

KARABAGIASA, Ioannis K.; BADEKAA, Anastasia V.; KONTAKOSB, Stavros; KARABOURNIOTIC, Sofia; KONTOMINASA, Michael G. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. **Food Chemistry**, v. 165, n. 15, p. 181-190, dez. 2014.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha Uruçu**: Biologia, Manejo e Conservação. Liber: Belo Horizonte, 1996.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food**: Principles and Practices. New York: Chapman & Hall. 1998.

LEE, P. C.; LEE, S. Y.; HONG, S. H.; CHANG, H. N.; LEE, W. G.; KWON, S. Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. **Appl Environ Microbiol**, v. 54, p. 23 – 27. 2000.

LEGLER, S. www.com.br/apicultura/pesquisas/inspeção\_mel, 01.doc. 2004.

LIRA, Aline F.; SOUSA, Juliana P. L. de Mello; LORENZON, Maria Cristina A.; VIANNA, Carlos

Alberto F. J.; CASTRO, Rosane N. Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.169-178, 2014.

MANTILLA, S. P. S. et al. ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA APLICADA EM MEL DE ABELHAS (*Apis mellifera*): UMA REVISÃO. **Colloquium Agrariae**, v. 8, n. 2, p. 75–84, 2012.

MANTELATTO, P. E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento**. 272 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2005.

MARCHINI, L. C., SODRÉ, G. S., MORETI, A. C. C. C. **Mel Brasileiro: Composição e Normas**. Ribeirão Preto: 2004. 111 p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V. ; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3. ed. New York: CRC Press, 1998. 386 p.

MENDES, C. D. G. et al. As Análises De Mel: Revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, p. 7–14, 2009.

MENEZES, Cristiano. **Abelhas sem ferrão e microrganismos – Parte 1**. Disponível em: <<http://abelha.org.br/abelhas-sem-ferrao-e-microrganismos-parte-1/>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

MOURA, Sinevaldo Gonçalves de. **Qualidade do mel de abelhas (*Apis Mellifera* L.) em função do ambiente e do tempo de armazenamento**. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

MOSKOWITZ, H. R. **Product Testing and Sensory Evaluation of Food-Marketing and R&D Approaches**. Westport: Food and Nutrition Press, 1983. 605 p.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. [s.l.: s.n.]. v. 34. 1997.

OHARA, André. Isolamento e seleção de leveduras silvestres de biomas do estado de São Paulo com potencial para produção de lipase e vitaminas do complexo B. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, 2014.

OLIVEIRA, E. G. et al. Qualidade microbiológica do mel de tiúba (*Melipona compressipes fasciculata*) produzido no Estado do Maranhão. **Higiene alimentar**, v. 19, n. 133, p. 92-99, 2005.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

PAULI, Elis Daiane; CRISTIANO, Valderi Cristiano; NIXDORF, Suzana Lucy. Método Para Determinação De Carboidratos Empregado Na Triagem De Adulterações Em Café. *Quim. Nova*, v. 34, n. 4, p. 689-694, 2011.

PENHA, Edmar das M.; MODESTA, Regina C. D.; GONÇALVES, Elisabeth B.; SILVA, Aline L. de S.; MORETTI, Roberto H. Efeito dos Teores de Álcool e Açúcar no Perfil Sensorial de Licor de Acerola. **Braz. J. Food Technol.**, v.6, n.1, p.33-42, 2003.

PEREIRA, Fábila de Mello; LOPES, Maria Teresa do Rêgo; CAMARGO, Ricardo Costa Rodrigues de; VILELA, Sérgio Luís de Oliveira. Produção de Mel. **Embrapa Meio-Norte**. v. 3, jul. 2003.

PEREIRA, Ana Paula Vicente. **Identificação Molecular de Candidoses invasivas no Centro Hospitalar Cova da Beira**, E.P.E. Dissertação (Mestrado) – Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

PEREDA, Juan A. Ordóñez; RODRÍGUEZ, María Isabel Cambero; ÁLVAREZ, Leónides Fernández; SANZ, María Luisa García; MINGUILLÓN, Gonzalo D. García de Fernando; PERALES, Lorenzo de La Hoz; CORTECERO, María Dolores Selgas. **Tecnologia de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1, 294p.

PODADERA, Priscilla. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixe de elétrons**. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PONTES, Pamella Rio Branco; SANTIAGO, Savanna Santos; SZABO, Tatiana Nogueira; TOLEDO, Luciana Passos; GOLLÜCKE, Andréa Pittelli Boiago. Atributos sensoriais e aceitação de sucos de uva comerciais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n.2, 2010.

POTTER, N. N. **Food science**. 5. ed. New York: Academic, 1995. 713 p.

PRADO, A. S. et al. Consumption habits and preferences by type of drink coffee (Coffea arabica L.) Between young people from Machado/MG. **Coffee Science**, v. 6, n. 3, p. 184–192, 2011.

RAO, M. A. Rheology of liquid foods: a review. **Journal of Texture Studies**, v. 8, n. 2, p. 135-168, 1977.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual – bactérias e fungos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 112p.

RYBAK-CHMIELEWSKA, Helena. Honey. In: SIKORSKI, Zdzislaw E. **Chemical and Functional Properties of Food Saccharides**. CRC Press, 2004. p. 83-90.

RYBAK-CHMIELEWSKA, Helena. Changes in the carbohydrate composition of honey undergoing during storage. **Journal of Apicultural Science**, v. 51, p. 39–48, 2007.

SANTOS, Ana Carolina de Melo et al. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SCHIRMER, Lenhart Robert. **Abelhas Ecológicas**. São Paulo: Livraria Nobel S. A. 1986. 218 p.

SEBRAE. **Oportunidades para o mercado de mel**. Disponível em: <[http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014\\_06\\_06\\_RT\\_Agroneq%C3%B3cio\\_Oportunidades\\_para\\_o\\_mercado\\_de\\_mel.pdf](http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Estudos%20e%20Pesquisas/2014_06_06_RT_Agroneq%C3%B3cio_Oportunidades_para_o_mercado_de_mel.pdf)>. Acesso em: 01 out. 2014.

SILVA, Robson Alves da; MAIA, Geraldo Arraes; SOUSA, Paulo Henrique Machado de; COSTA, José Maria Correia da. Composição e Propriedades Terapêuticas do Mel de Abelha. **Alim. Nutr.**, v.17, n.1, p.113-120, jan./mar. 2006.

SILVA, J. A. **Tópicos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. 227 p.

SILVA, Mariana B. de L. et al. Qualidade microbiológica de méis produzidos por pequenos apicultores e de méis de entrepostos registrados no serviço de inspeção federal no estado de Minas Gerais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.4, p. 417-420, out./dez. 2008.

SILVA, Kelly de Fátima Nogueira Lima; SANTOS, Dyego da Costa Santos; SILVA, Charles Teles Santos da; QUEIROZ, Alexandre José de Melo; LIMA, Afonso Odério Nogueira. Comportamento reológico do mel de *Apis mellifera* do município de Tabuleiro do Norte-CE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 04, n. 01: p. 52-57 , 2010.

SILVA, I. A. A. DA et al. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3252–3258, 2013.

SODRÉ, G. D. S. et al. Perfil sensorial e aceitabilidade de méis de abelhas sem ferrão submetidos a processos de conservação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 72–77, 2008.

SOUZA, Bruno de Almeida et al. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 29, n. 4, p. 798-802, out.-dez. 2009.

SOUZA, R. C. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F. P. M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amaz.** v.,34, p. 333-336, 2004.

SNOWDON, J. A. The microbiology of honey - meeting your buyers specifications (Why they do what they do). **American Bee Journal**. v. 1, p.51-60, 1999.

STRAMM, Klaus Martin. **Composição e qualidade de méis de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*), efeitos de estocagem e comparação com méis de *Apis mellifera***. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

TONG, X., YANG, M., LI, Y. **Biomass into chemicals**: Conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes, *Applied Catalysis A: General*, v. 385, p. 1-13, 2010.

VÁZQUEZ, L. Castro; MAROTO, M. C. Diaz; VINAS, M. A. Gonzales; FUENTE, E. DE LA; COELLO, M. S. Perez. Influence of Storage Conditions on Chemical Composition and Sensory Properties of Citrus Honey. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 1999–2006, 2008.

VENIR, Elena; SPAZIANI, Massimiliano; MALTINI, Enrico. Crystallization in „Tarassaco” Italian honey studied by DSC. **Food Chemistry**, v. 122, p. 410–415, 2010.

VILLANUEVA, Nilda D. M. ; PETENATE, Ademir J.; DA SILVA, Maria A. A. P. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**. v. 16, n. 8, p. 691-703, dez. 2005.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão**. [s.l: s.n.]. 2012.

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. **Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil**. 2005. Disponível em:<<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 19 mar. 2017.

VISQUERT, Mario; VARGAS, Maria; ESCRICHE, Isabel. Effect of postharvest storage conditions on the colour and freshness parameters of raw honey. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 181–187, 2014.

VIT P; PERSANO Oddo L.; MARANO, M. L. Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. **Apidologie**, v. 29, p. 377-389, 1998.

WEISBURG, William G.et al. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WELKE, Juliane Elisa; REGINATTO, Sabrina; FERREIRA, Débora; VICENZI, Raul; SOARES, José Maria. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, 2008.

WIESE, Helmuth. **Apicultura**: Novos Tempos. 2 ed. Guaíba: Agrolivro, 2005. 375 p.

WHITE JÚNIOR, J. W. Honey. **Advances in Food Research**, v. 22, p. 287-374, 1978.

WHITE, T. J.; BRUNS; T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. 1990.

YANNIOTIS, S.; SKALTSI, S.; KARABURNIOTI, S. Effect of moisture content on the viscosity of honey at different temperatures. **Journal of Food Engineering**, v. 72, p. 372–377, 2006.

**APÊNDICES****APÊNDICE A****Questionário de Recrutamento de Julgadores****(Análise Descritiva Quantitativa)**

Desejamos formar uma equipe de julgadores treinados, a fim de descrever o perfil sensorial de amostras de mel maturadas. Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A equipe de provadores se reunirá 2 vezes por semana por um período de 30 minutos, no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA por um período aproximado de 4 meses. Se você deseja participar da equipe de julgadores, por favor, preencha este formulário. Este trabalho faz parte do projeto "Maturação de mel de meliponíneos". Caso necessite de algum esclarecimento ou informações adicionais, não hesite em entrar em contato com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Prudêncio (Tel.: 3371.4986, e-mail: sandrah@uel.br).

Nome: \_\_\_\_\_  
Telefone: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

1) Faixa etária:

- 15-25
- 26-35
- 36-50
- Acima de 50 anos

2) Sexo:

- Feminino
- Masculino

3) Ocupação:

- Aluno
- Funcionário
- Professor
- Outro

4) Escolaridade:

- 1° Grau
- 2° Grau
- 3° Grau
- Outro

5) Indique a frequência de consumo de mel:

- 7 dias na semana
- 6 a 4 dias na semana
- 3 a 1 dias na semana
- 1 vez por mês ou menos
- Nunca
- Outro. Indique: \_\_\_\_\_

6) Cite 3 alimentos que sejam firmes.

7) Cite um alimento que grude no dente ao ser mastigado.

8) Cite um alimento que seja pegajoso ao ser mastigado.

9) Especifique os alimentos que você não pode comer ou beber por razões de saúde. Explique por favor.

10) Identifique se você possui:

- Diabetes
- Hipoglicemia
- Doença bucal
- Dentadura/prótese dentária parcial ou total
- Hipertensão (pressão alta)
- Hipotensão (pressão baixa)

11) Já participou de algum teste sensorial?  Sim  Não

Se sim, qual o tipo?

- Aceitação
- Discriminativo
- Descritivo

## APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
(Análise Descritiva Quantitativa)

## “Maturação de mel de meliponíneos”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“MATURAÇÃO DE MEL DE MELIPONÍNEOS”**, a ser realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é acompanhar o processo de maturação do mel de meliponíneos por meio dos parâmetros físico-químicos e sensoriais. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: desejamos formar uma equipe de julgadores treinada, capacitada para medir a intensidade das características sensoriais de aparência, aroma, sabor e textura das amostras de mel. Para isso, antes dos testes os participantes deverão responder o Questionário de Recrutamento de Provedores ou Julgadores, e então participar dos testes de seleção e treinamentos para depois avaliar as amostras de mel. Todas as sessões de teste (seleção, treinamento e avaliações das amostras) serão previamente agendadas. Sua participação no teste irá requerer 30 minutos em cada sessão, a qual acontecerá 2 vezes por semana, por um período aproximado de 4 meses. Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são contribuir com o aumento no tempo de conservação do mel e desenvolvimento de um produto de alto valor agregado. Quanto aos riscos, são mínimos associados à ingestão do mel do presente projeto de pesquisa, por se tratar de um produto seguro. Caso ocorra algum tipo de desconforto, físico, psíquico, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, em qualquer etapa da pesquisa, o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora, podendo ser dispensado dos testes a qualquer momento. Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Profa. Sandra Helena Prudêncio, DCTA /CCA / UEL / Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km

380, s/n, fones: (43) 3371-4986, (43)9903-1659, e-mail: sandrah@uel.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

### **Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.

## APÊNDICE C

## Questionário de Recrutamento de Julgadores

(Teste de Aceitação de Atributos)

Desejamos formar uma equipe de julgadores, a fim de avaliar o quanto você gostou de algumas características sensoriais de amostras de mel. Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, levará em torno de 30 minutos e você poderá fazê-la no horário em que tiver maior disponibilidade. Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário. Caso necessite de algum esclarecimento ou informações adicionais, não hesite em entrar em contato com a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Helena Prudêncio (Tel.: 3371.4986, e-mail: sandrah@uel.br).

Nome: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

- 1) Faixa etária:
- 15-25
  - 26-35
  - 36-50
  - Acima de 50 anos
- 2) Sexo:
- Feminino
  - Masculino
- 3) Ocupação:
- Aluno
  - Funcionário
  - Professor
  - Outro
- 4) Escolaridade:
- 1° Grau
  - 2° Grau
  - 3° Grau
  - Outro
- 5) Indique a frequência de consumo de mel:
- 7 dias na semana
  - 6 a 4 dias na semana
  - 3 a 1 dias na semana
  - 1 vez por mês ou menos
  - Nunca
  - Outro. Indique: \_\_\_\_\_
- 6) Identifique se você possui:
- Diabetes
  - Hipoglicemia
  - Doença bucal
  - Dentadura/prótese dentária parcial ou total
  - Hipertensão (pressão alta)
  - Hipotensão (pressão baixa)
- 7) Já participou de algum teste sensorial?  Sim  Não  
 Se sim, qual o tipo?
- Aceitação
  - Discriminativo
  - Descritivo

## APÊNDICE D

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
(Teste de Aceitação de Atributos)

## “Maturação de mel de meliponíneos”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“MATURAÇÃO DE MEL DE MELIPONÍNEOS”**, a ser realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é acompanhar o processo de maturação do mel de meliponíneos por meio dos parâmetros físico-químicos e sensoriais. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: desejamos formar uma equipe de consumidores para avaliar o quanto gosta do mel. Para isso, antes dos testes os participantes deverão responder o Questionário de Recrutamento de Provedores ou Julgadores, e então participar da avaliação das amostras respondendo o quanto gostou da aparência, aroma, sabor, textura e a aceitação global, que serão fornecidas durante a sessão de avaliação previamente agendada. Sua participação no teste irá requerer 30 minutos.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são contribuir com o aumento no tempo de conservação do mel e desenvolvimento de um produto de alto valor agregado. Quanto aos riscos, são mínimos associados à ingestão do mel do presente projeto de pesquisa, por se tratar de um produto seguro. Caso ocorra algum tipo de desconforto, físico, psíquico, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, em qualquer etapa da pesquisa, o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora, podendo ser dispensado dos testes a qualquer momento. Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Profa. Sandra Helena Prudêncio, DCTA /CCA / UEL / Rodovia Celso Garcia Cid - Pr 445 Km 380, s/n, fones: (43) 3371-4986, (43)9903-1659, e-mail: sandrah@uel.br), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina,

situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: [cep268@uel.br](mailto:cep268@uel.br).

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

### **Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs.: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, o texto deve estar voltado para os pais e deve ser incluído ainda, campo para assinatura do menor e do responsável.





## APÊNDICE G

## Ficha para Levantamento dos Termos Descritores

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## LEVANTAMENTO DE TERMOS DESCRITORES

Por favor, prove as duas amostras quanto à aparência, aroma, sabor e textura e indique em que elas são similares e em que são diferentes.

Amostras: \_\_\_\_\_ e \_\_\_\_\_

APARÊNCIA:

AROMA:

SABOR:

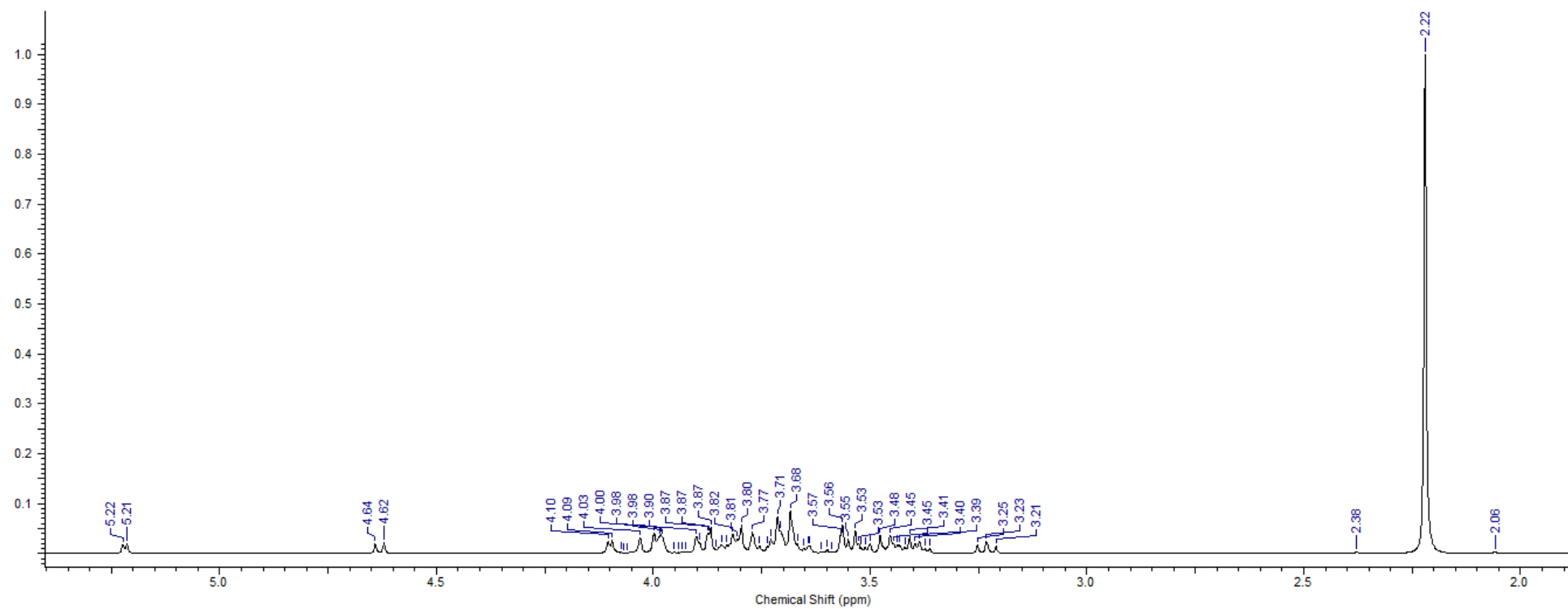
TEXTURA:

## APÊNDICE H

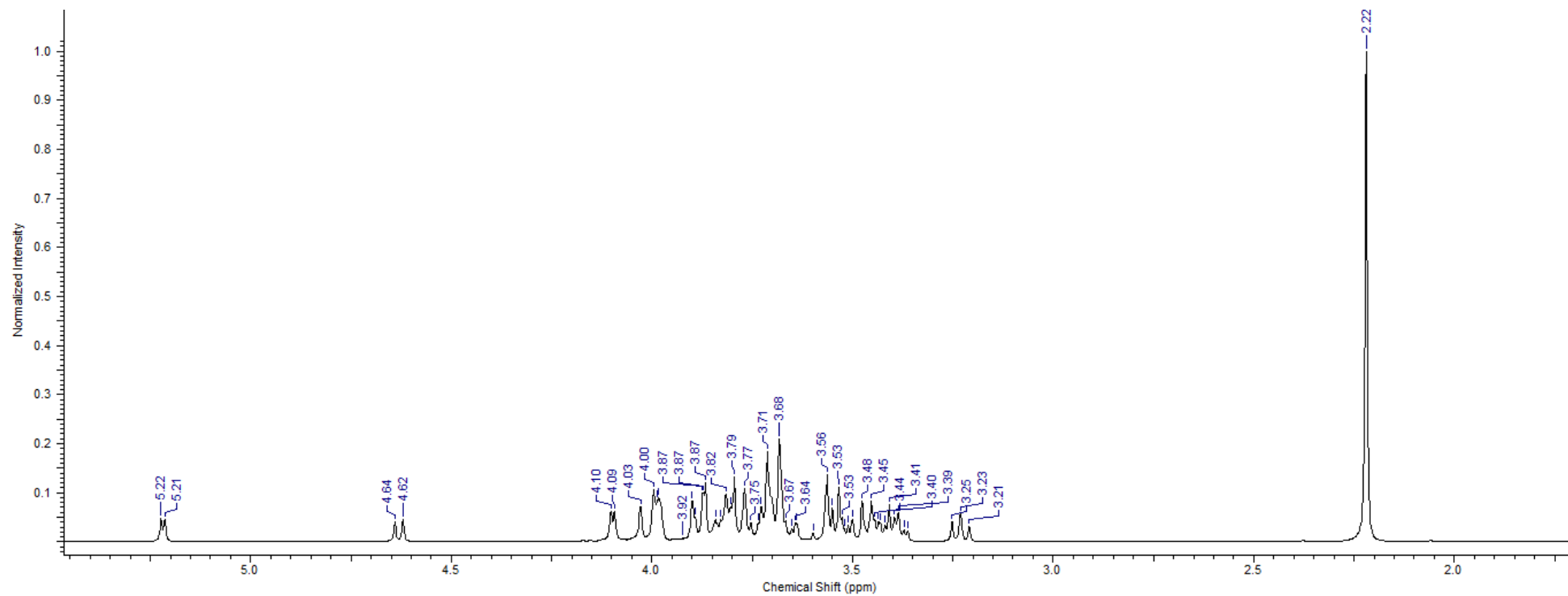
## Espectros Ressonância Magnética Nuclear

- a) **Tempo Inicial**
- b) **Amostra Pasteurizada**
- c) **Maturação 1 – 15 dias**
- d) **Maturação 1 – 30 dias**
- e) **Maturação 1 – 45 dias**
- f) **Maturação 1 – 60 dias**
- g) **Maturação 1 – 75 dias**
- h) **Maturação 1 – 90 dias**
- i) **Maturação 1 – 105 dias**
- j) **Maturação 1 – 120 dias**
- k) **Maturação 1 – 135 dias**
- l) **Maturação 1 – 150 dias**
- m) **Maturação 1 – 165 dias**
- n) **Maturação 1 – 180 dias**
- o) **Maturação 2 – 15 dias**
- p) **Maturação 2 – 30 dias**
- q) **Maturação 2 – 45 dias**
- r) **Maturação 2 – 60 dias**
- s) **Maturação 2 – 75 dias**
- t) **Maturação 2 – 90 dias**
- u) **Maturação 2 – 105 dias**
- v) **Maturação 2 – 120 dias**
- w) **Maturação 2 – 135 dias**
- x) **Maturação 2 – 150 dias**
- y) **Maturação 2 – 165 dias**
- z) **Maturação 2 – 180 dias**

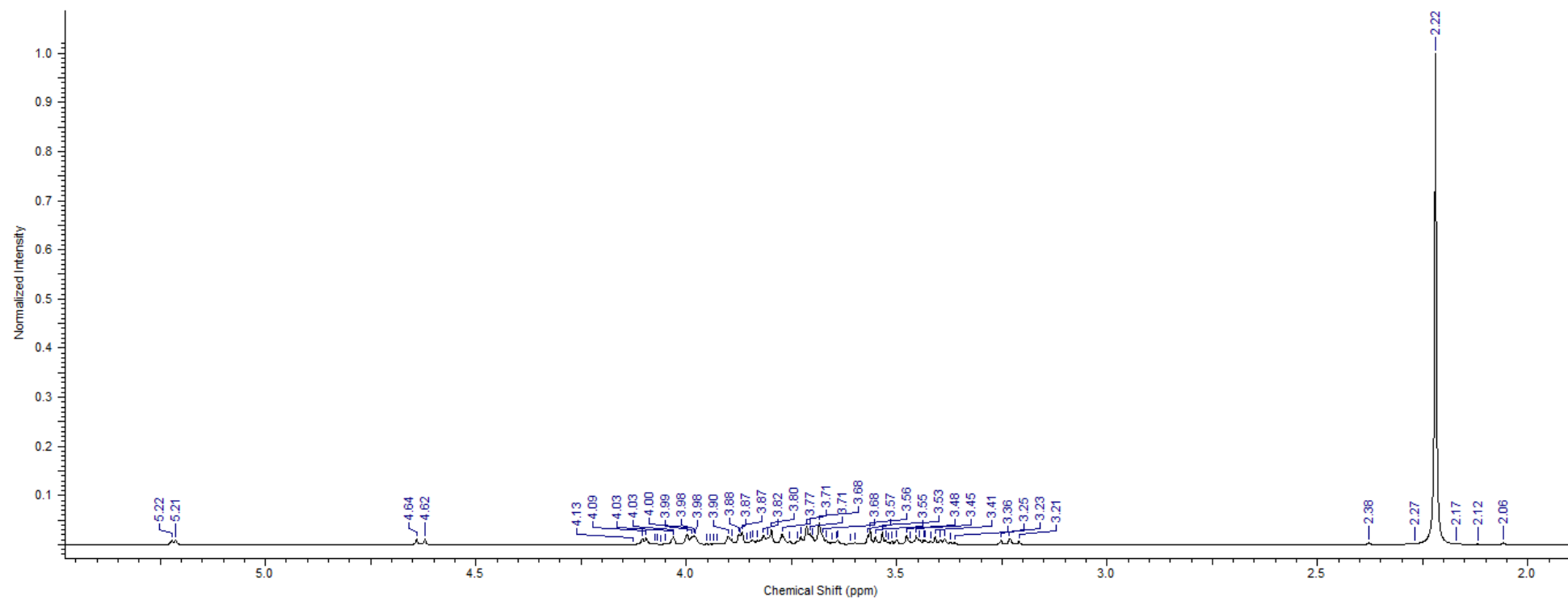
a)

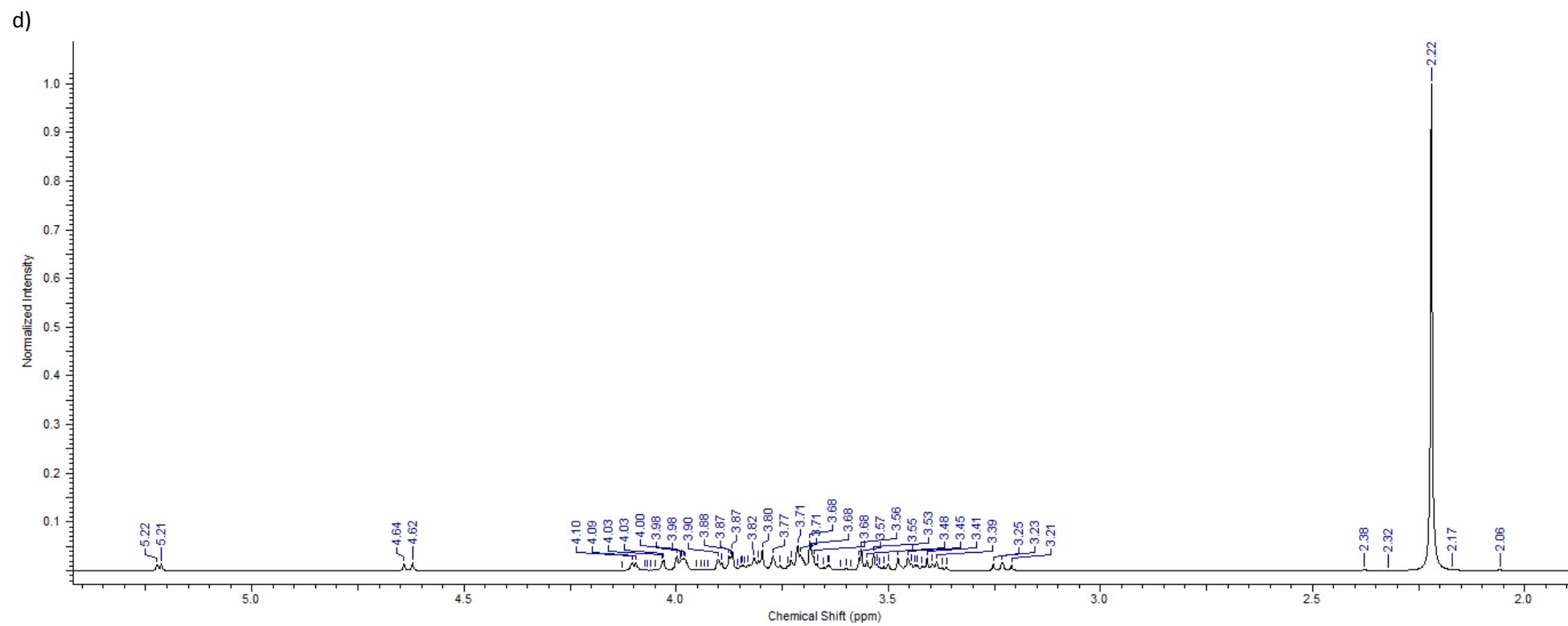


b)

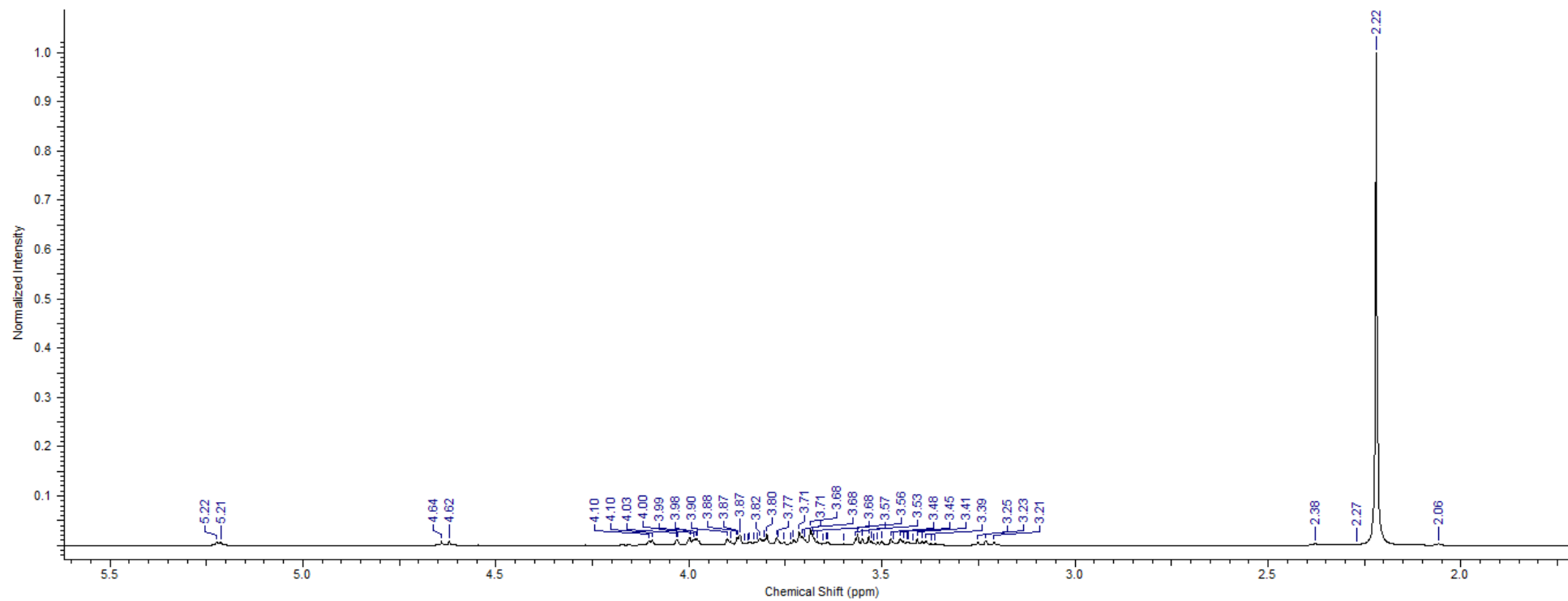


c)

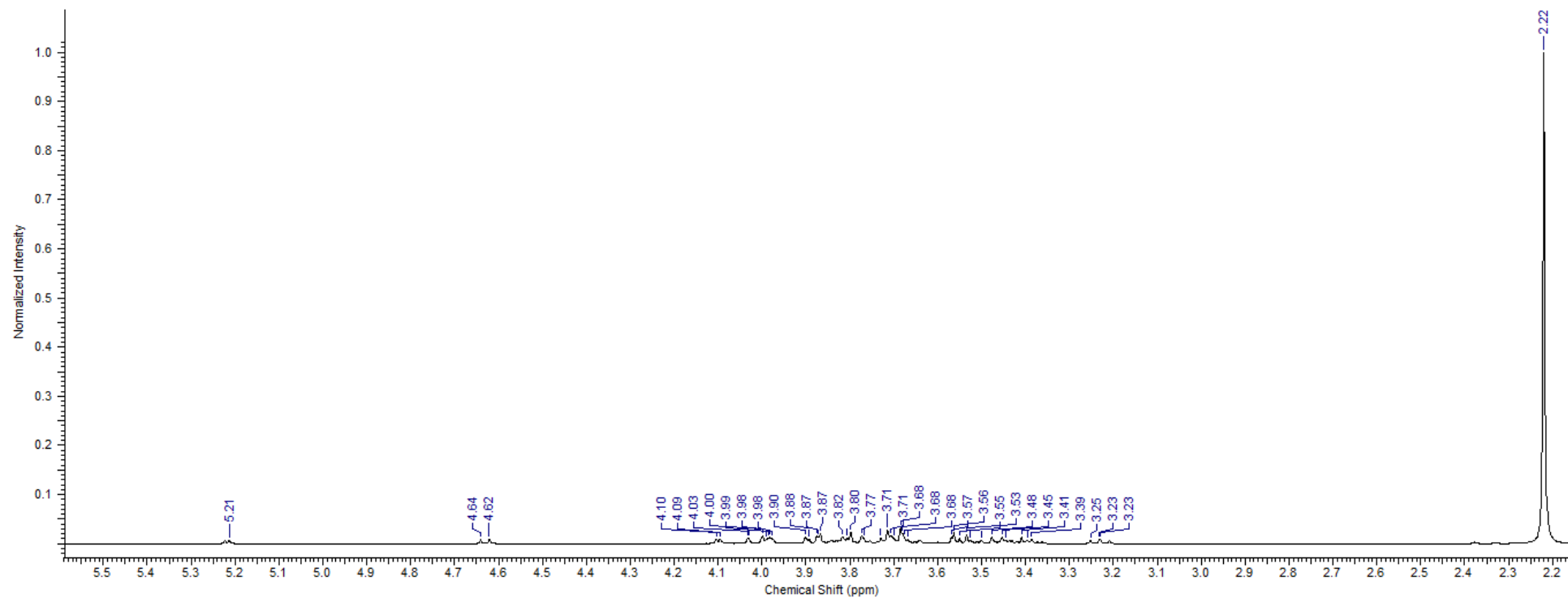




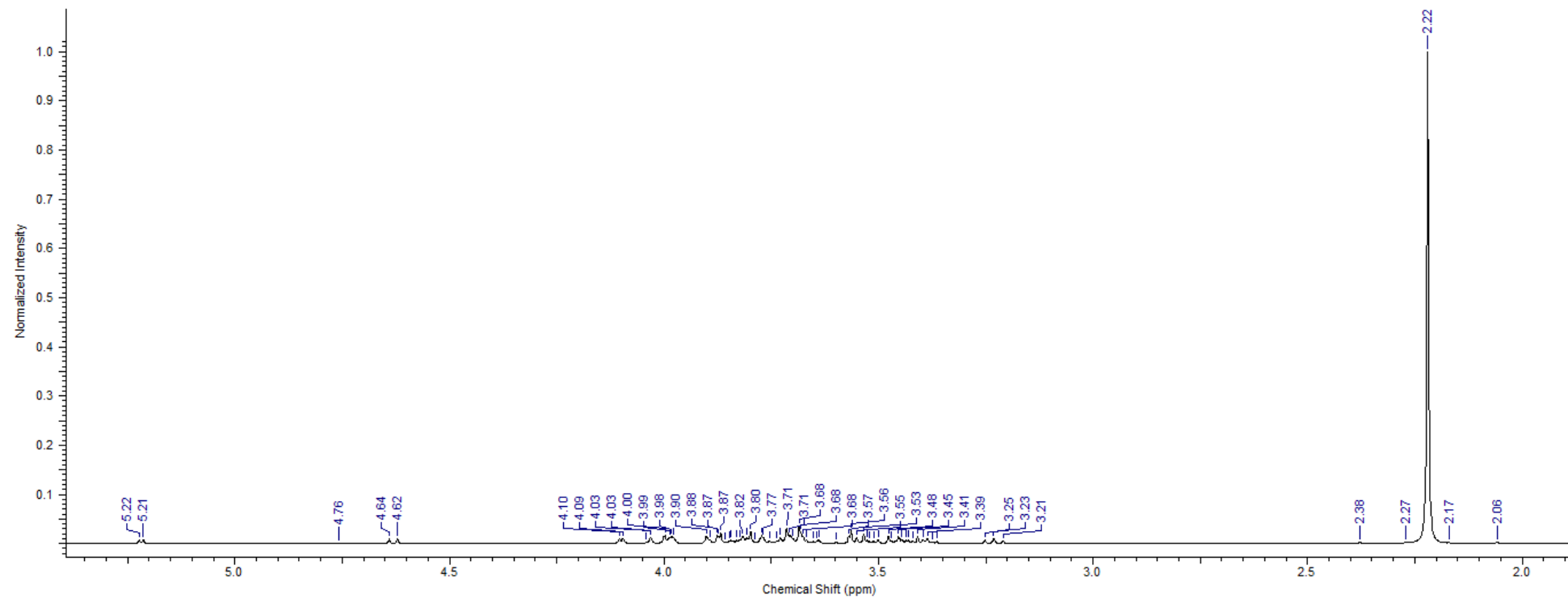
e)



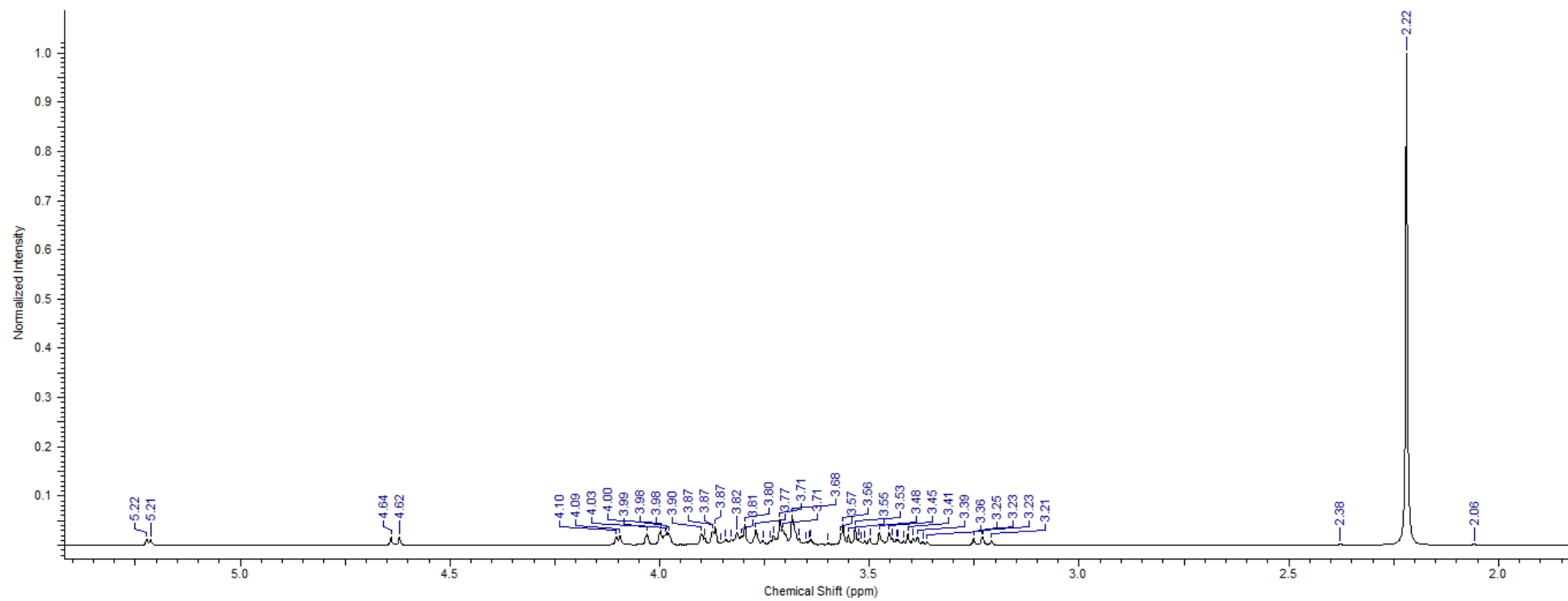
f)



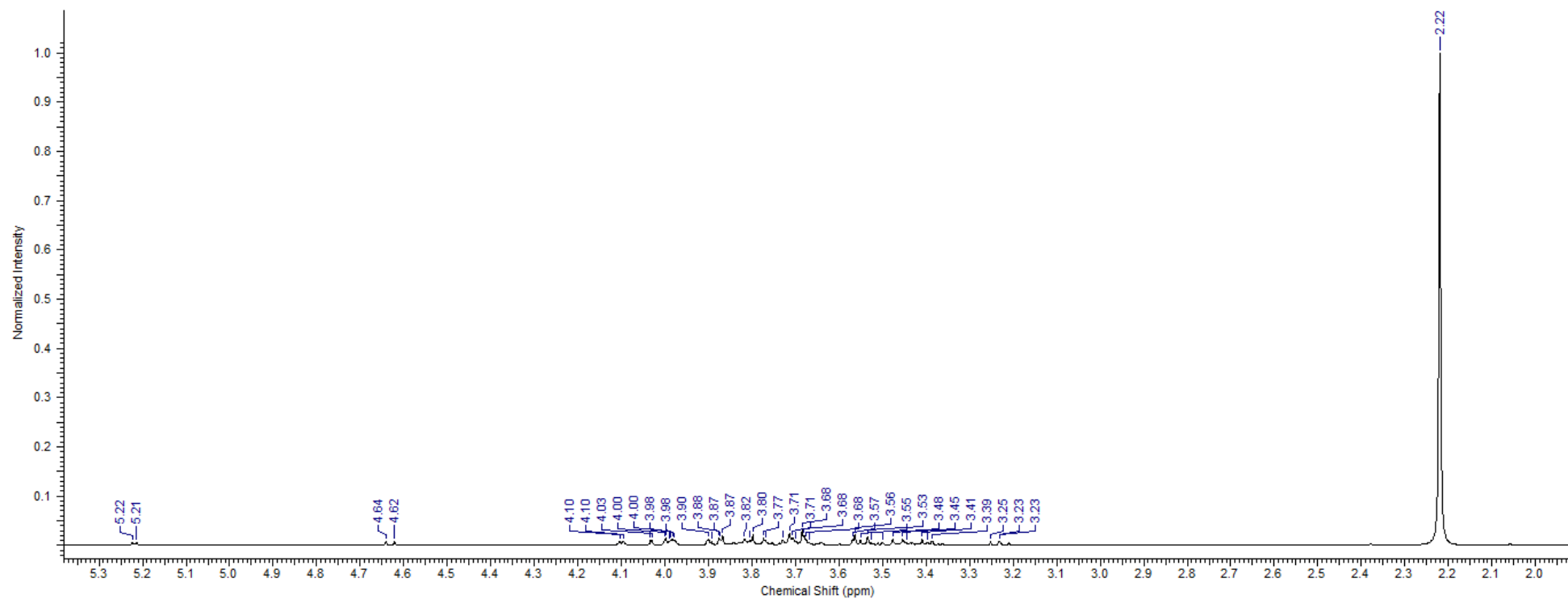
g)



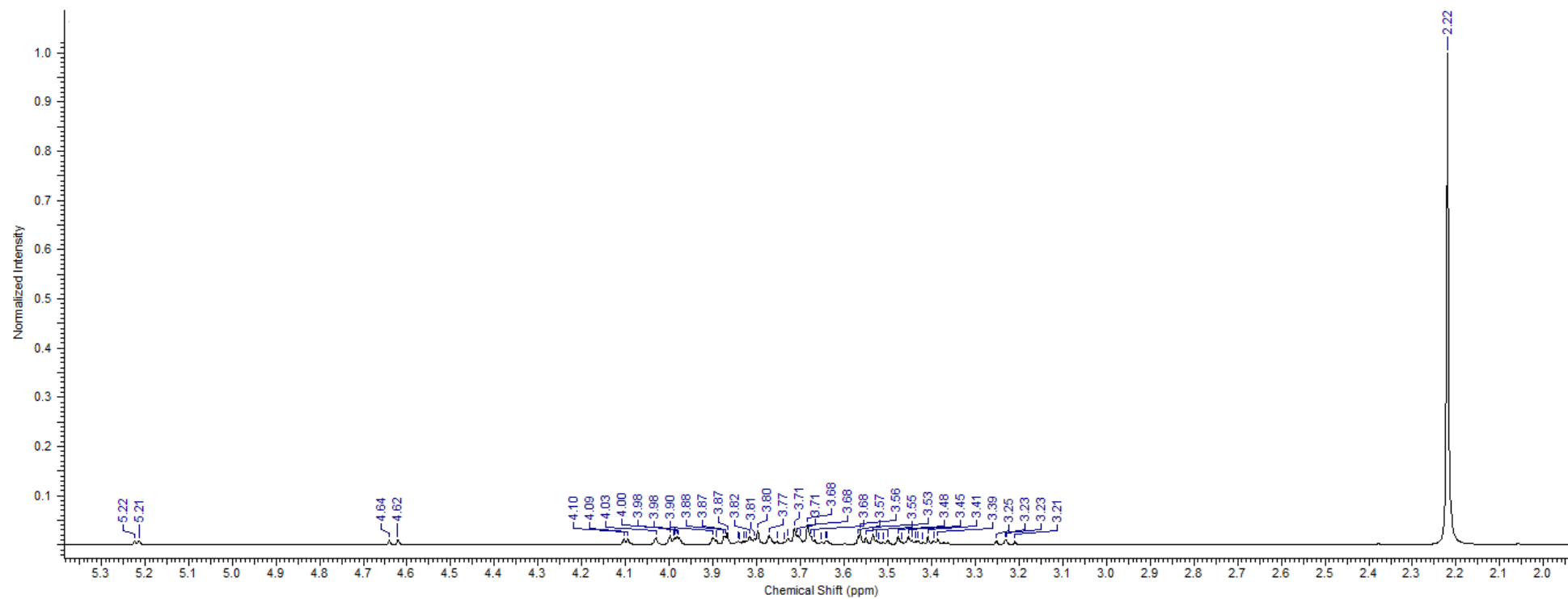
h)



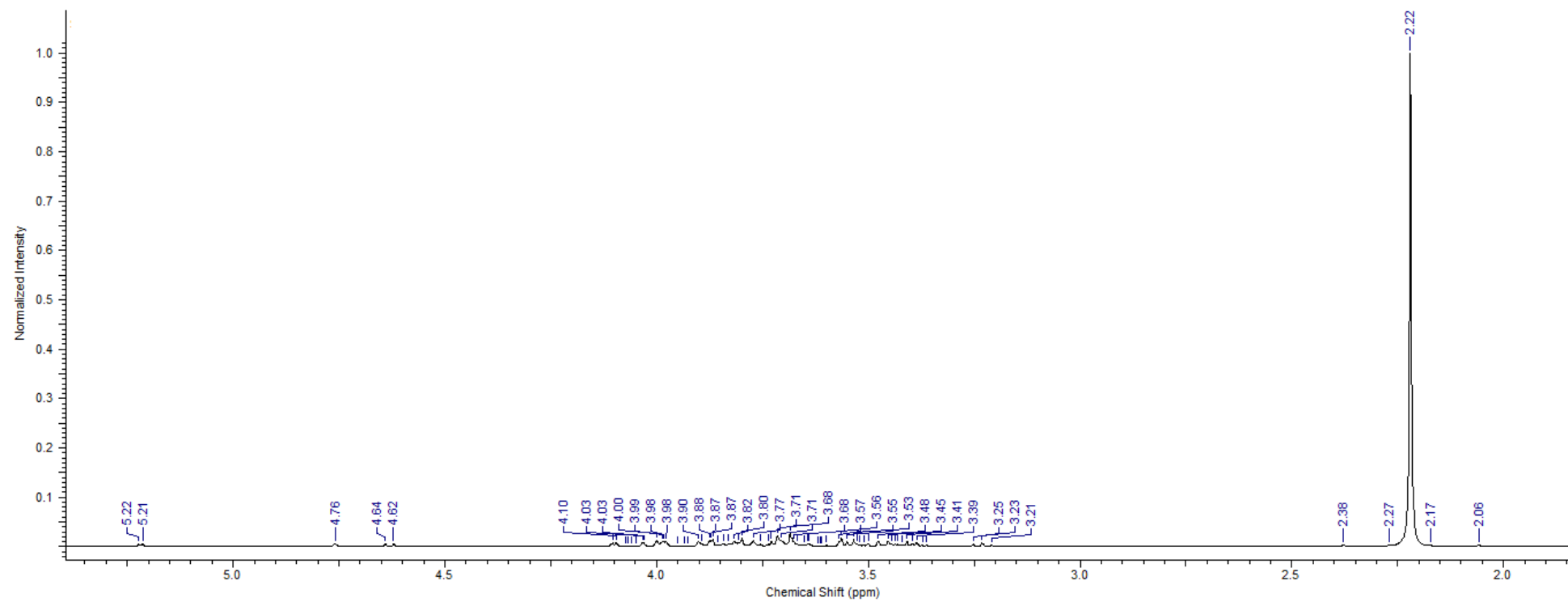
i)



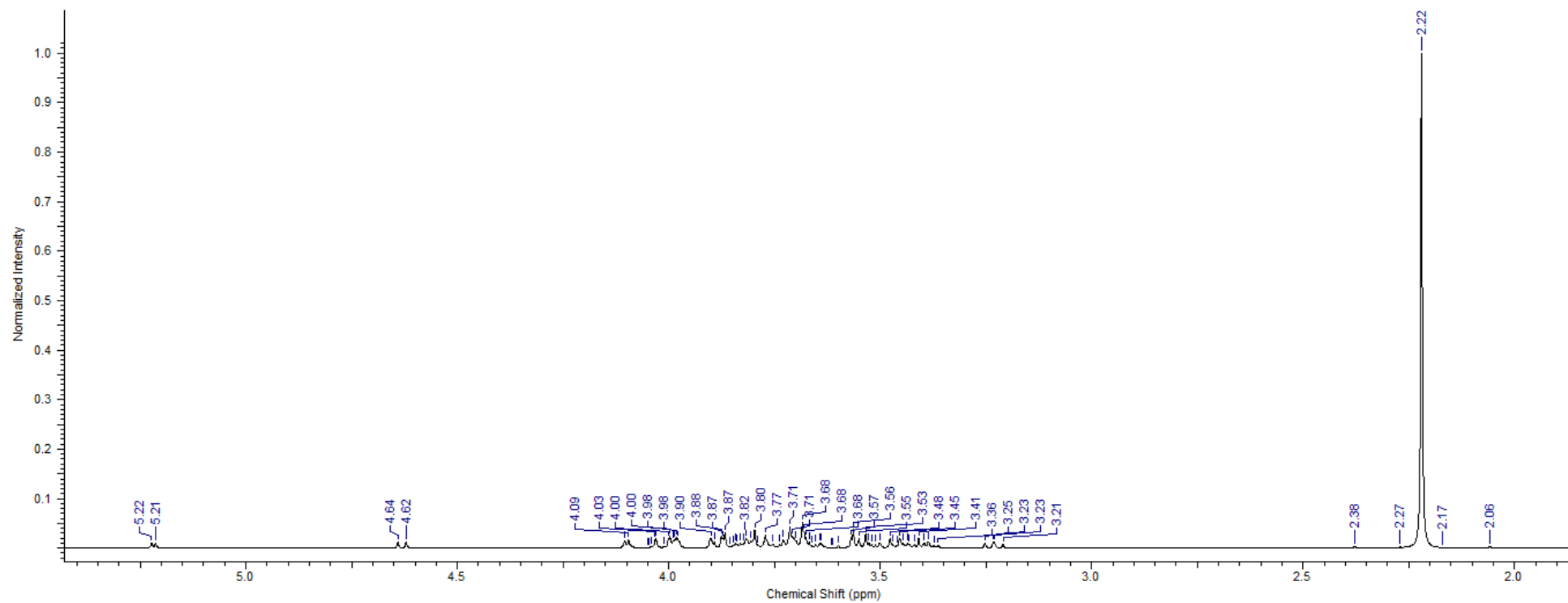
j)



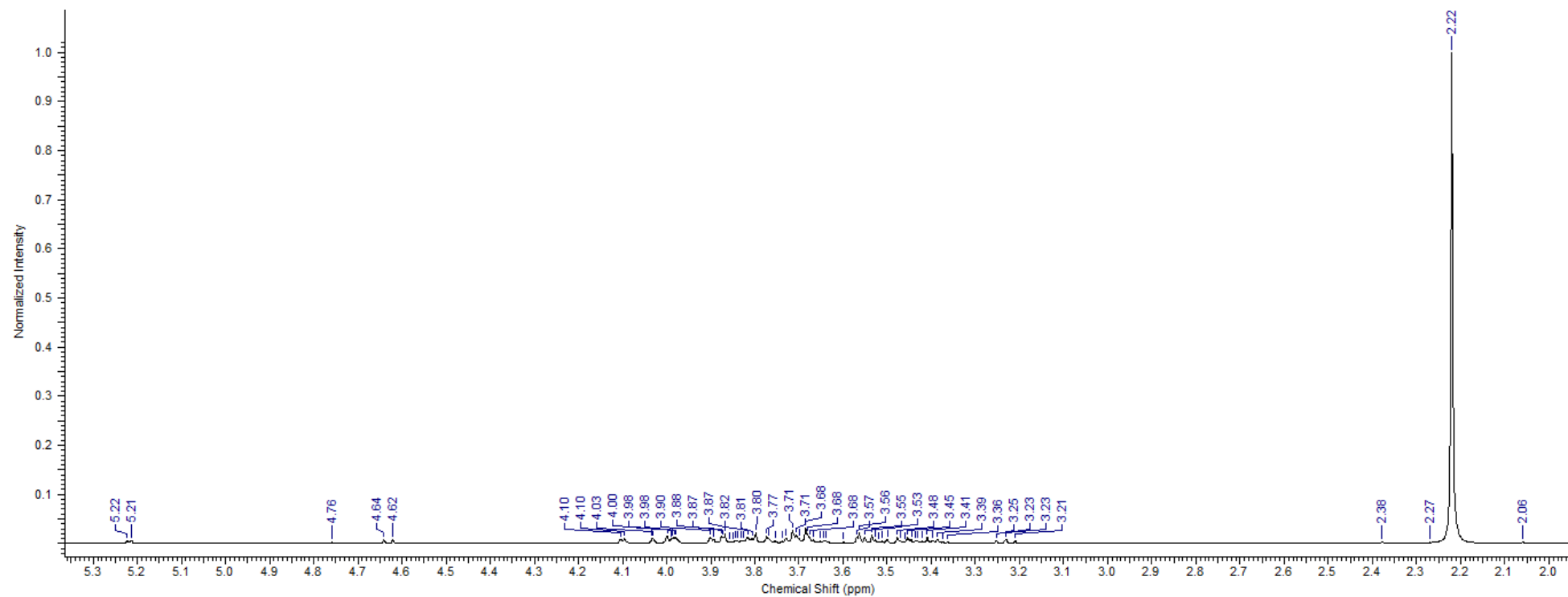
k)



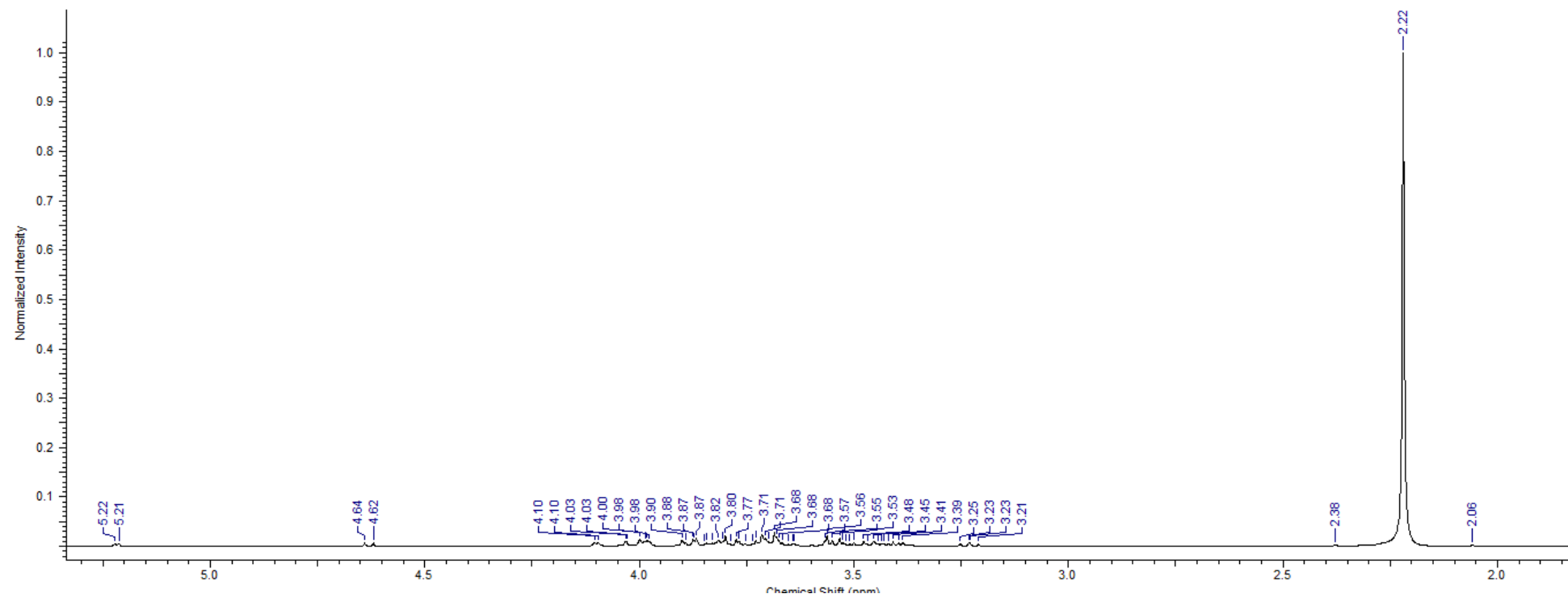
l)



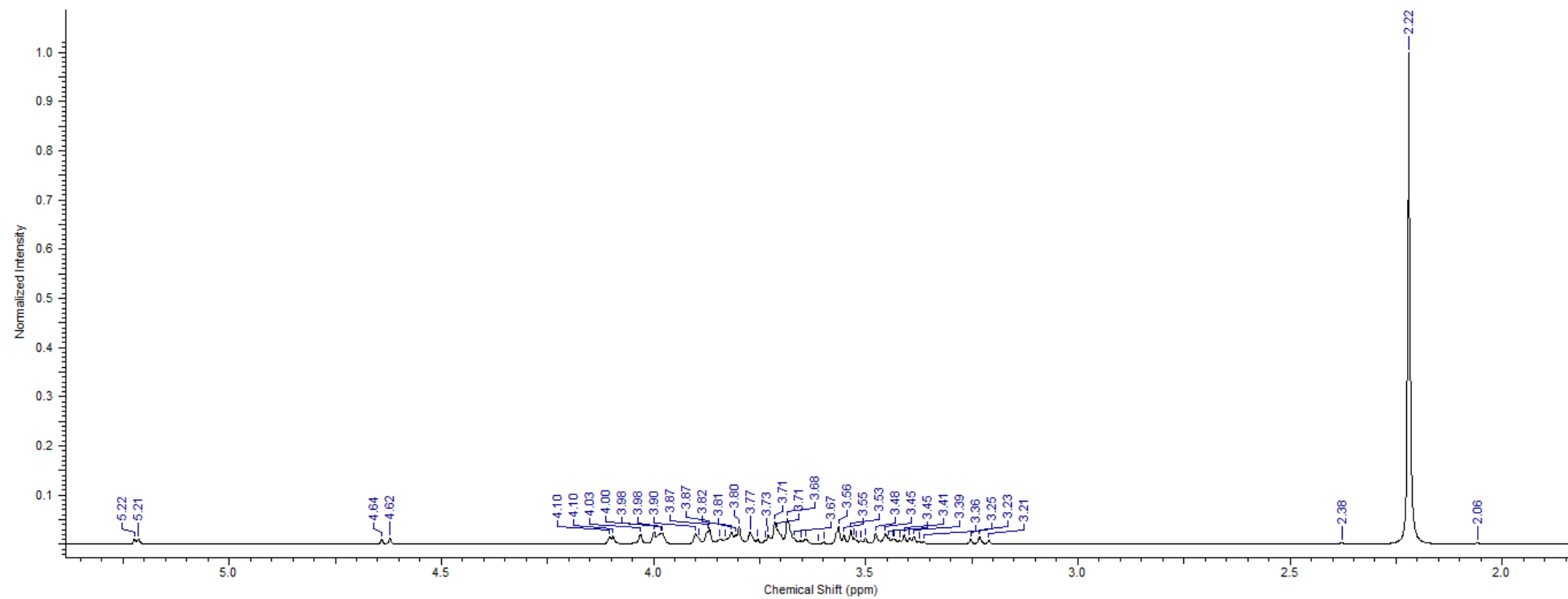
m)



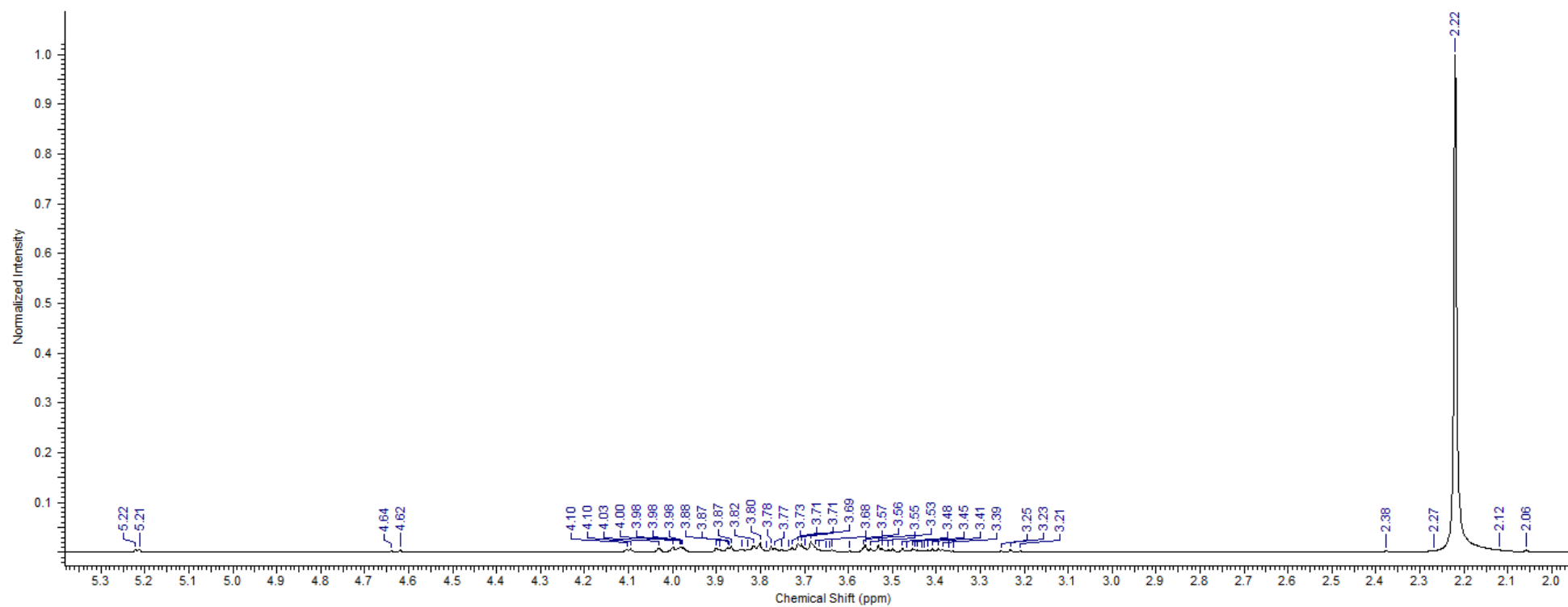
n)



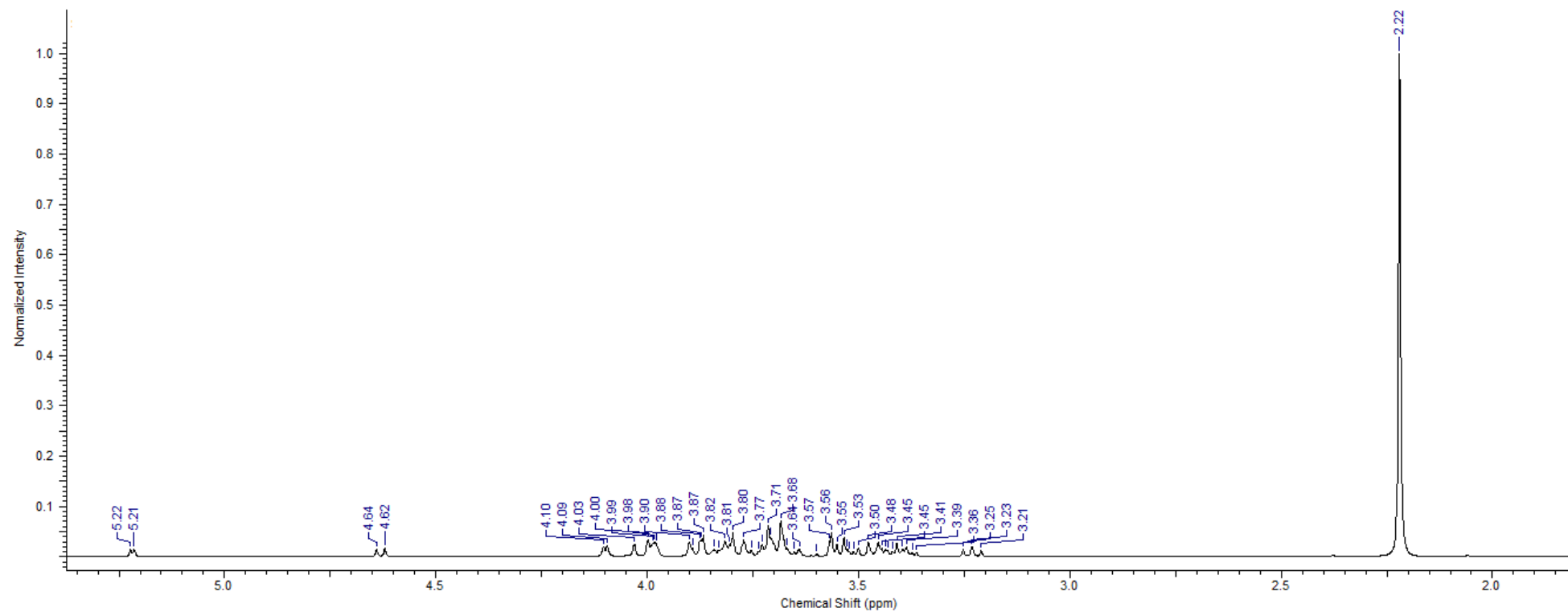
o)



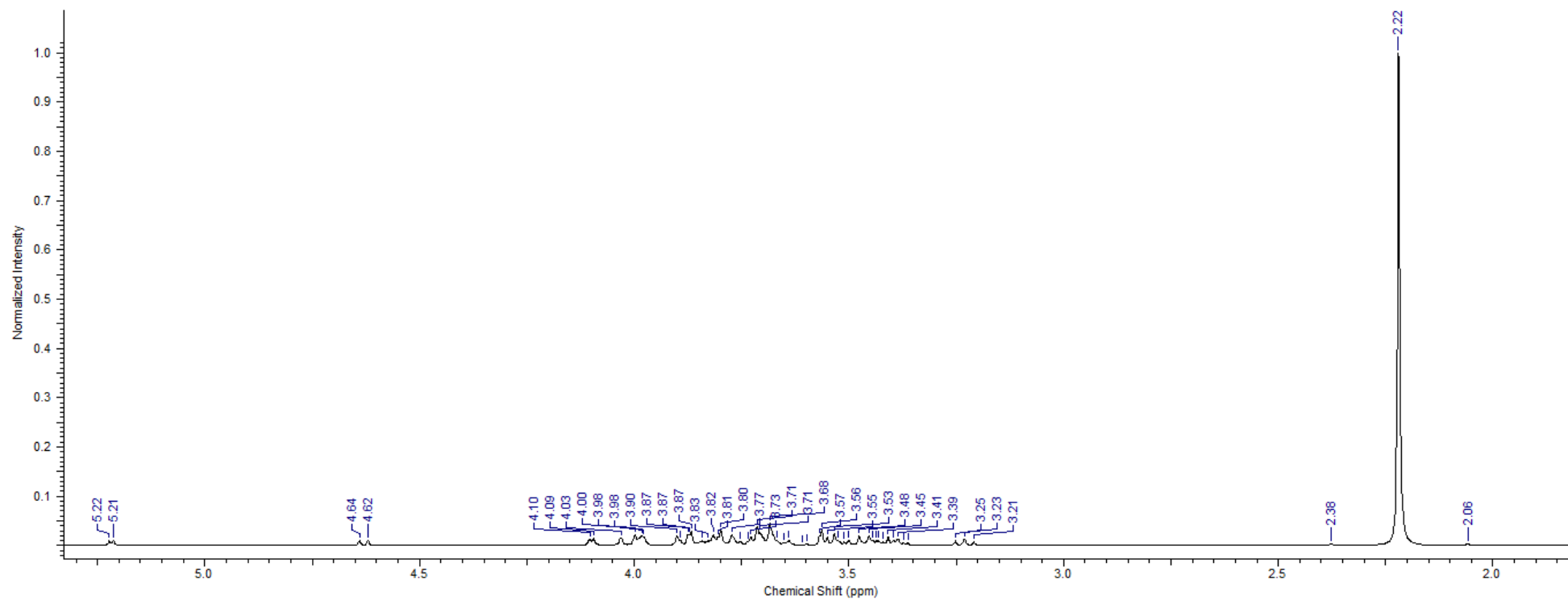
p)



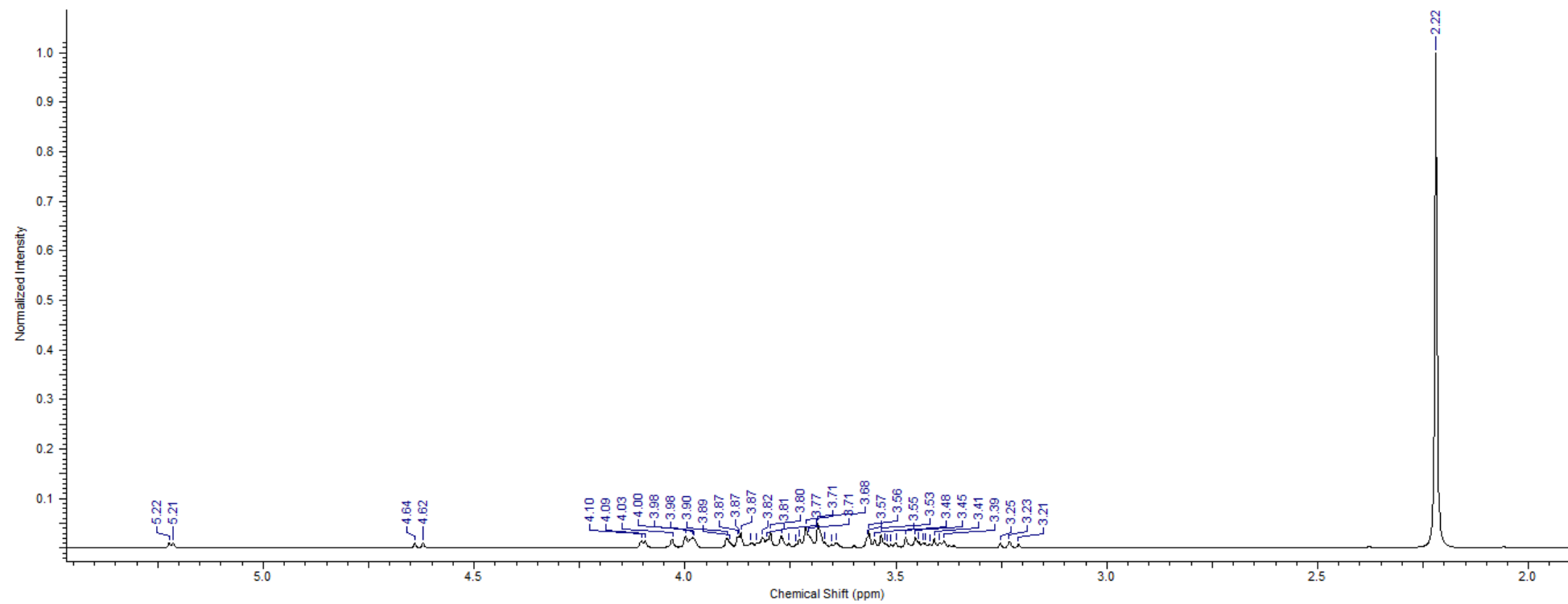
q)



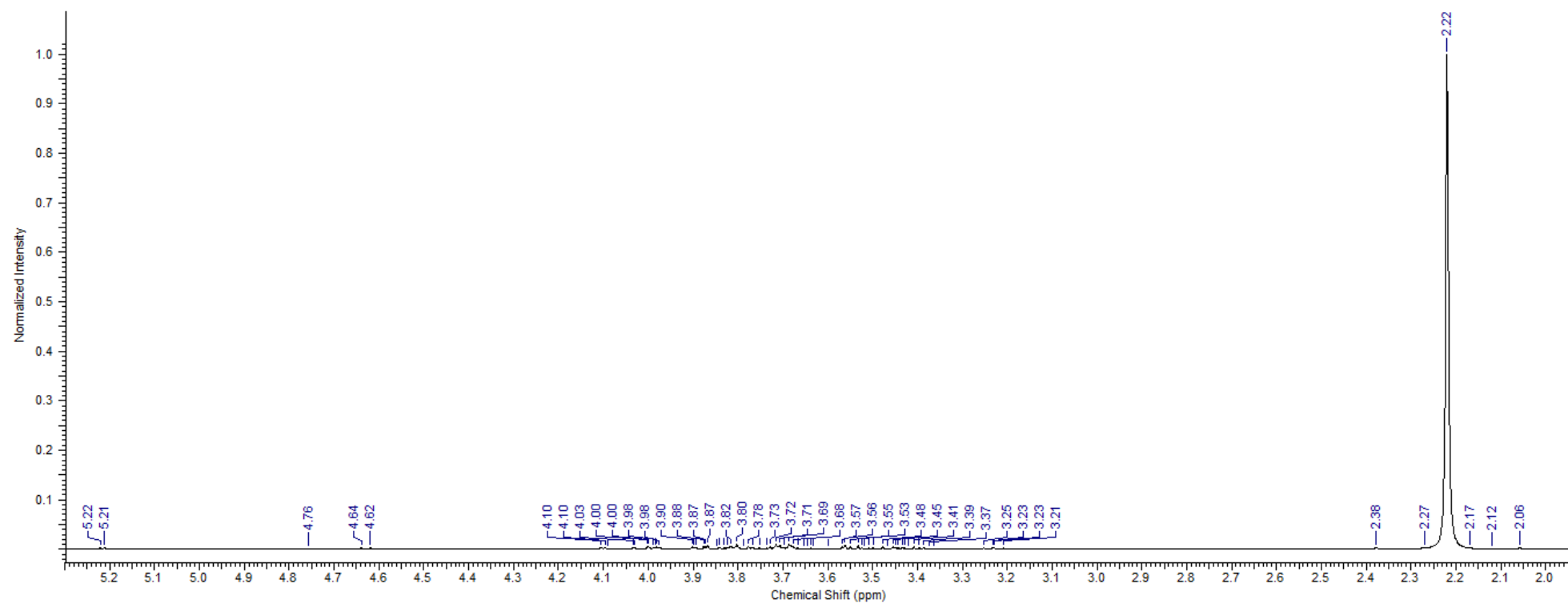
r)



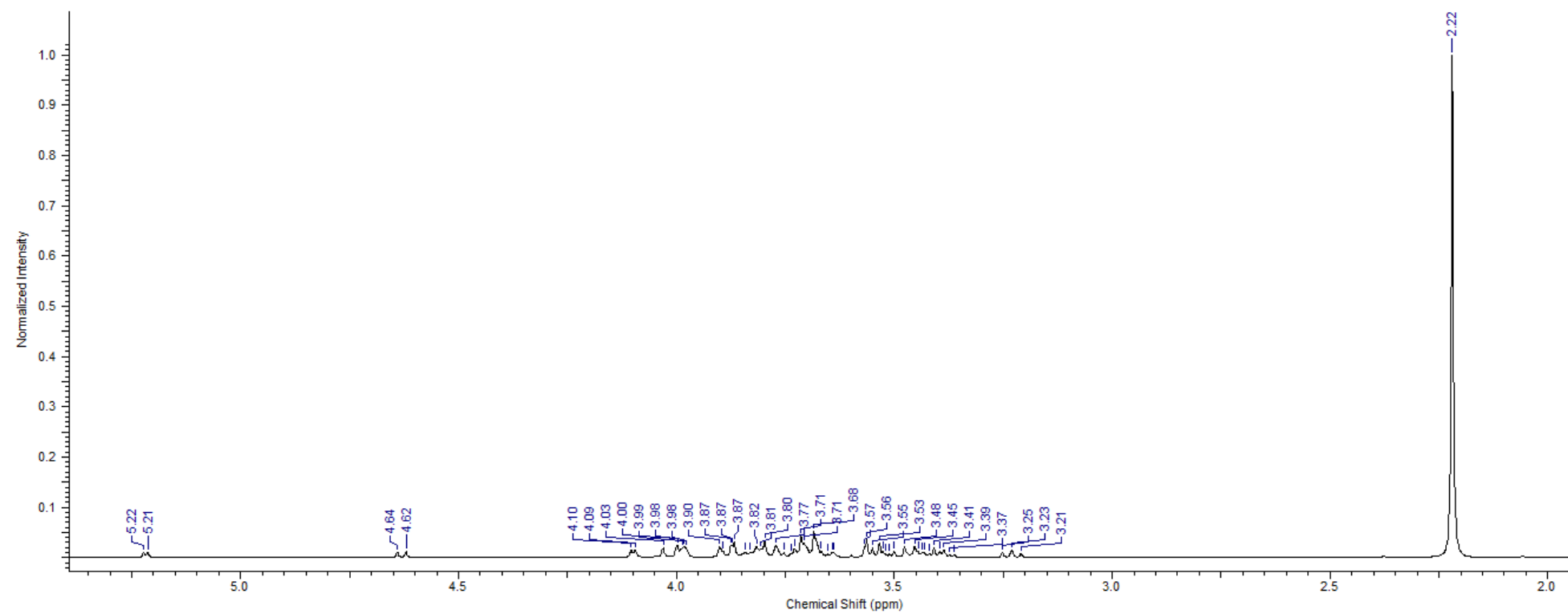
s)



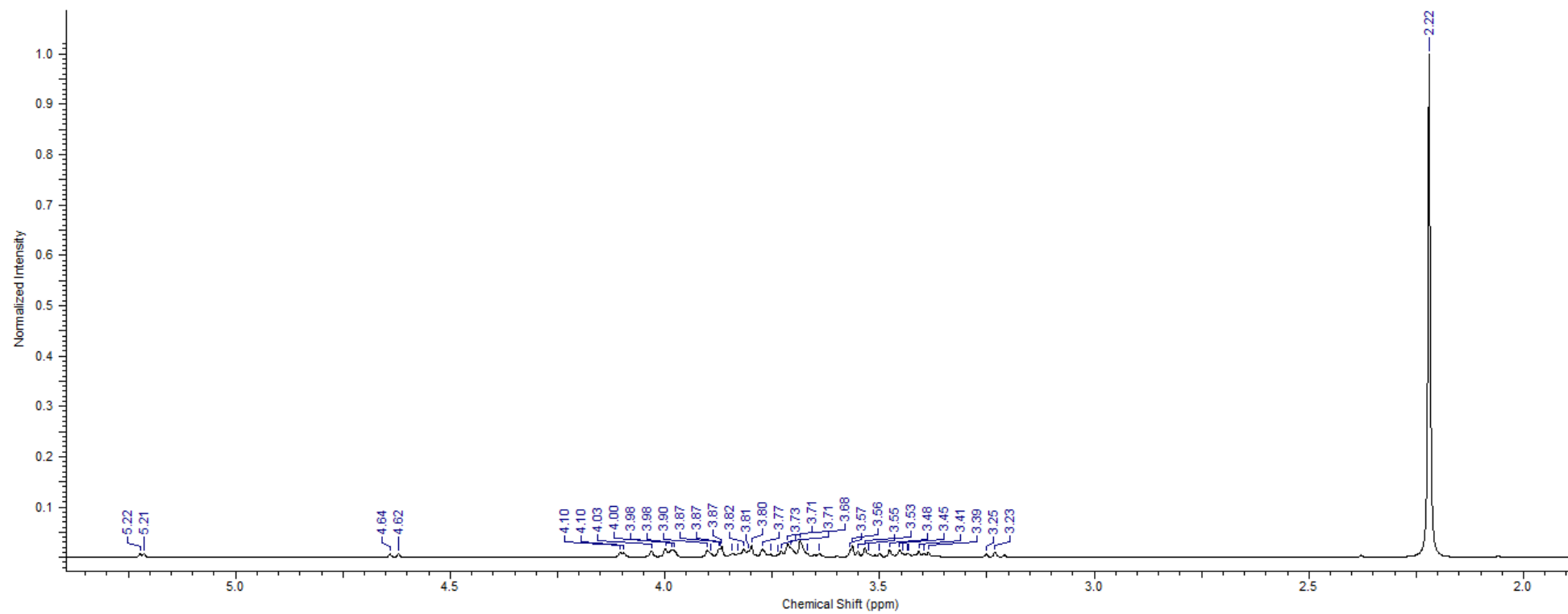
t)



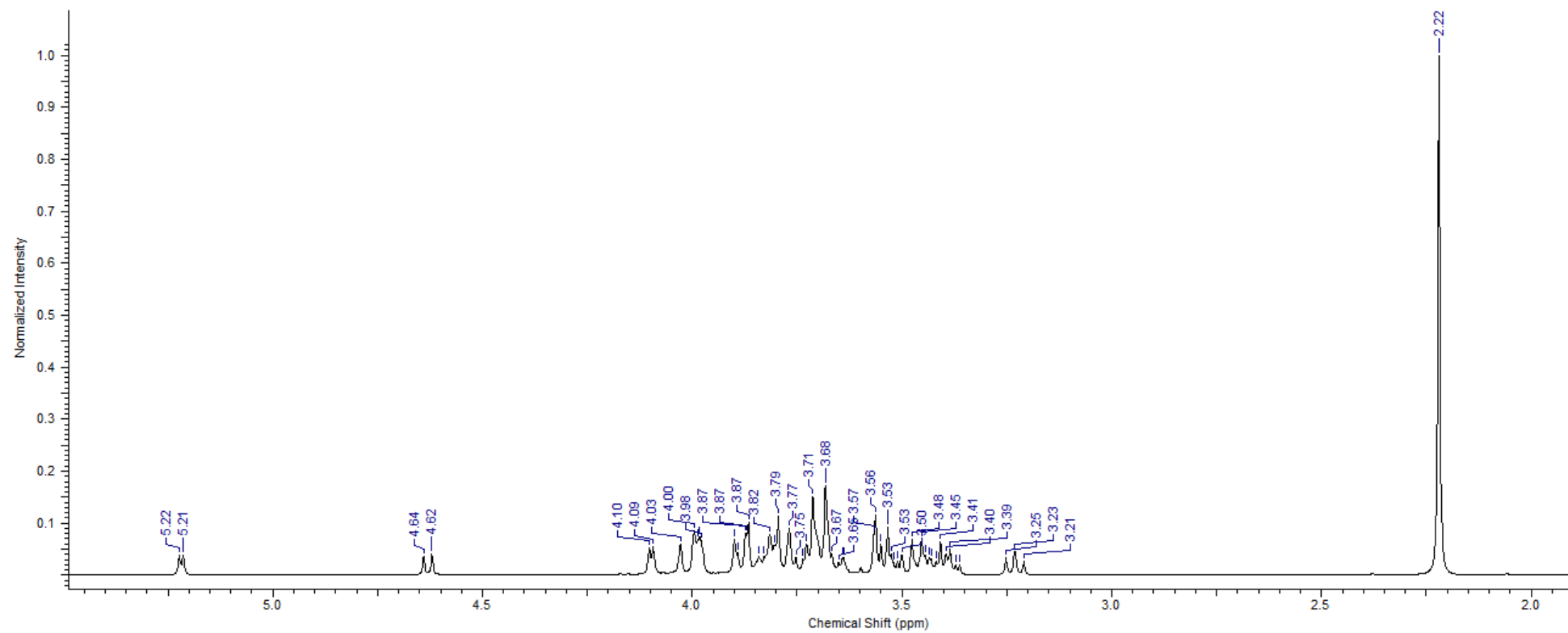
u)



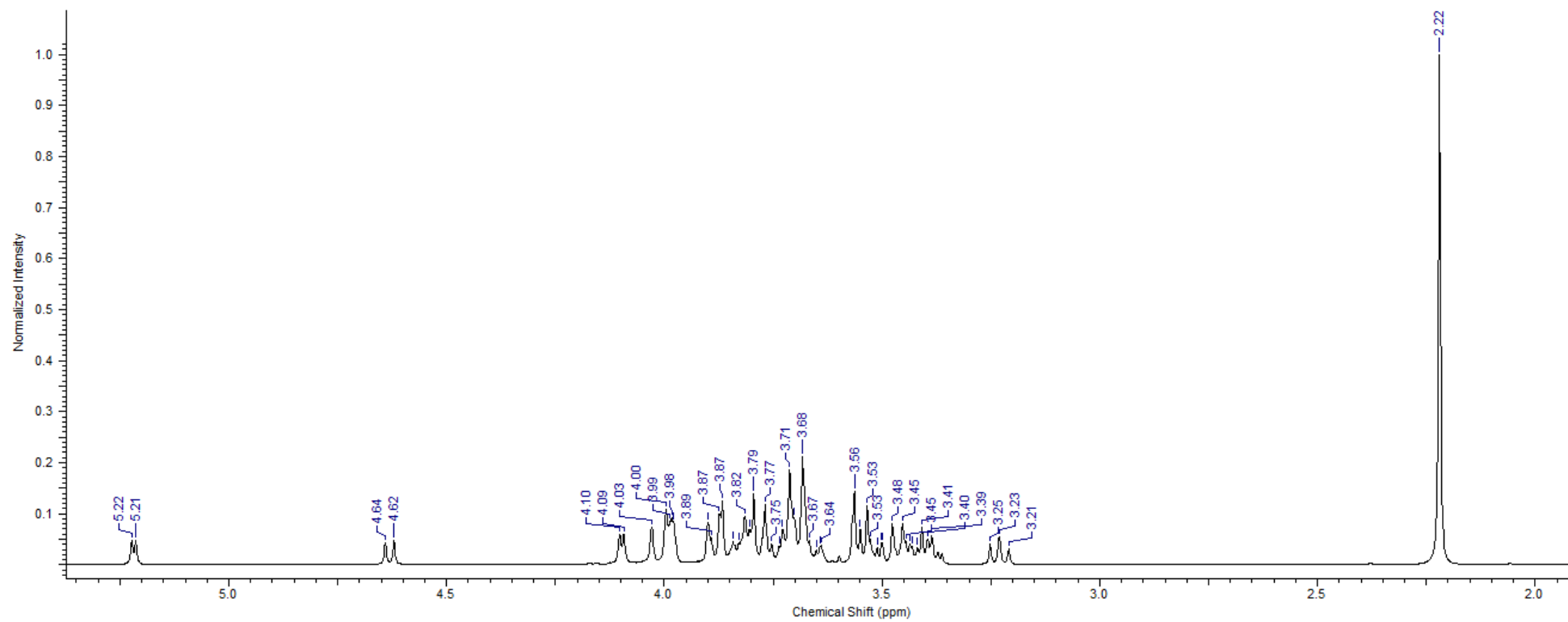
v)



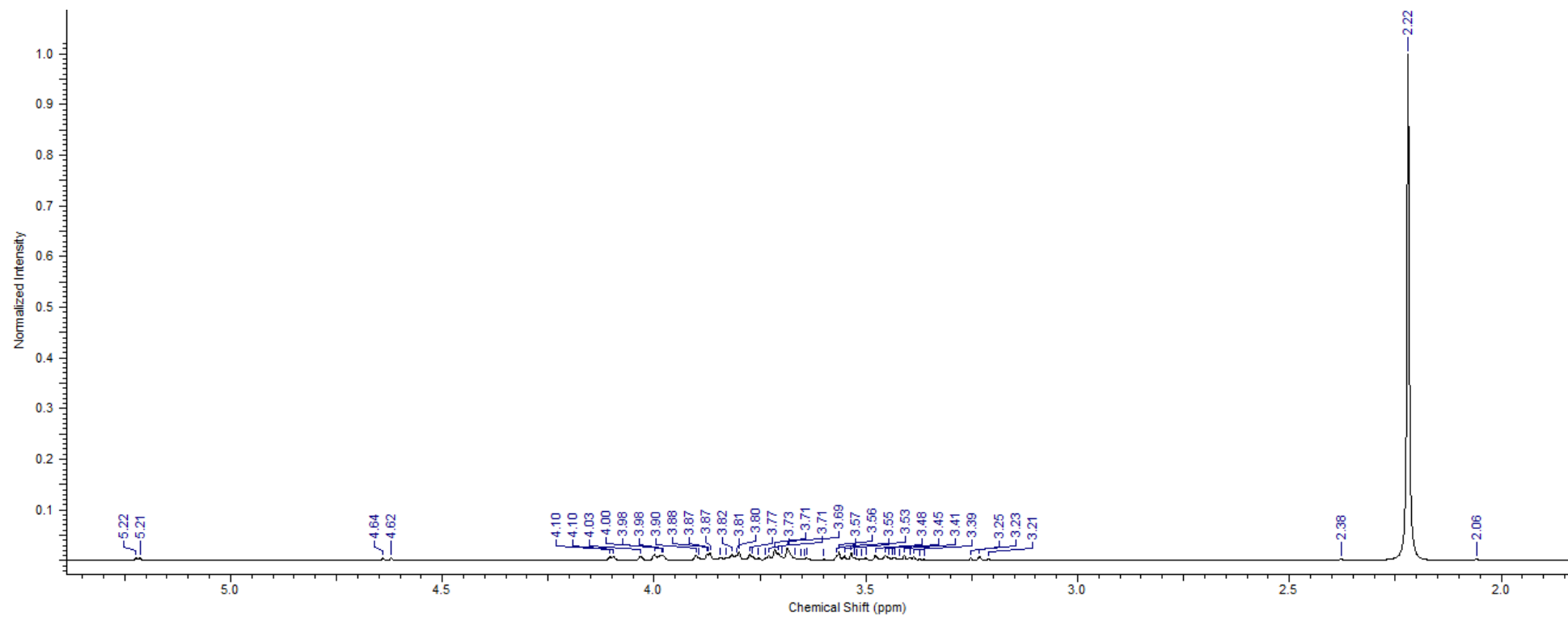
w)



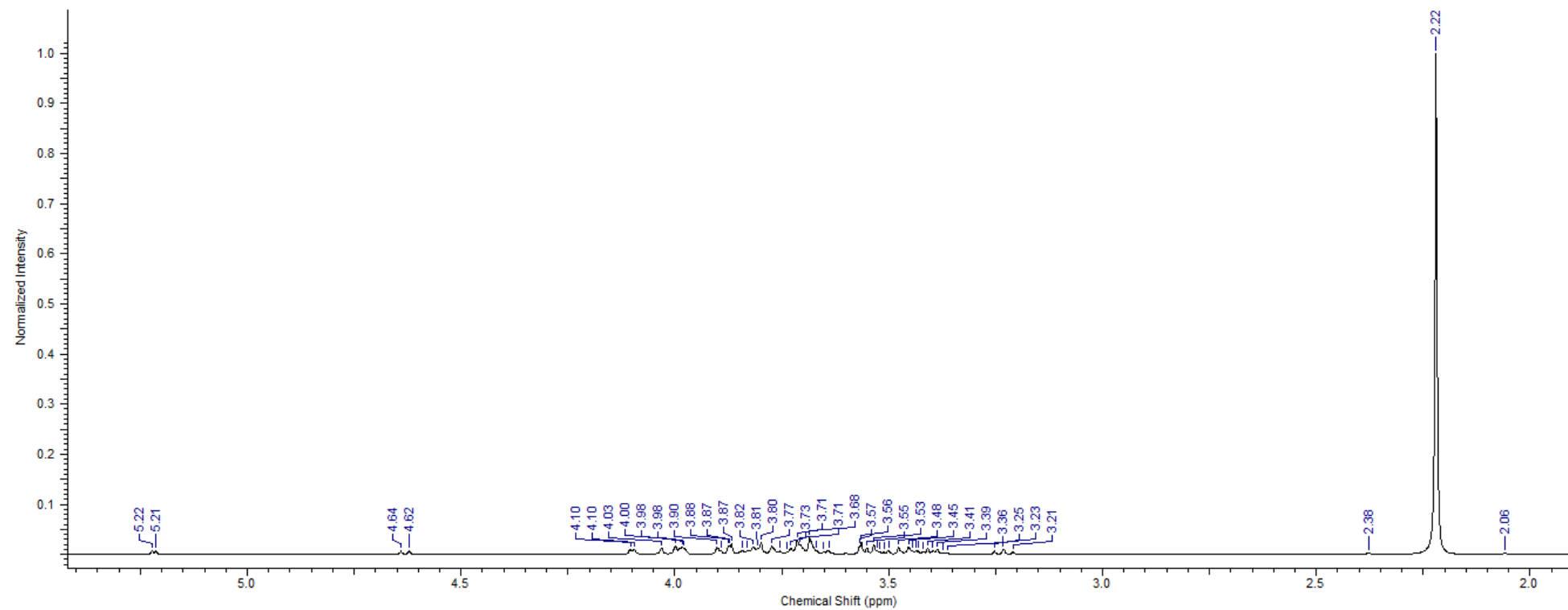
x)



y)



z)



## APÊNDICE I

Composição dos meios para purificação da microbiota

BHI

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Caldo BHI	Conforme o rótulo

YMA

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Extrato de levedura	3 g
Extrato de malte	3 g
Peptona bacteriológica	5 g
Glicose	10 g
Ágar	20 g

MRS

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Meio MRS Ágar	Conforme o rótulo

MYP

Camada inferior:

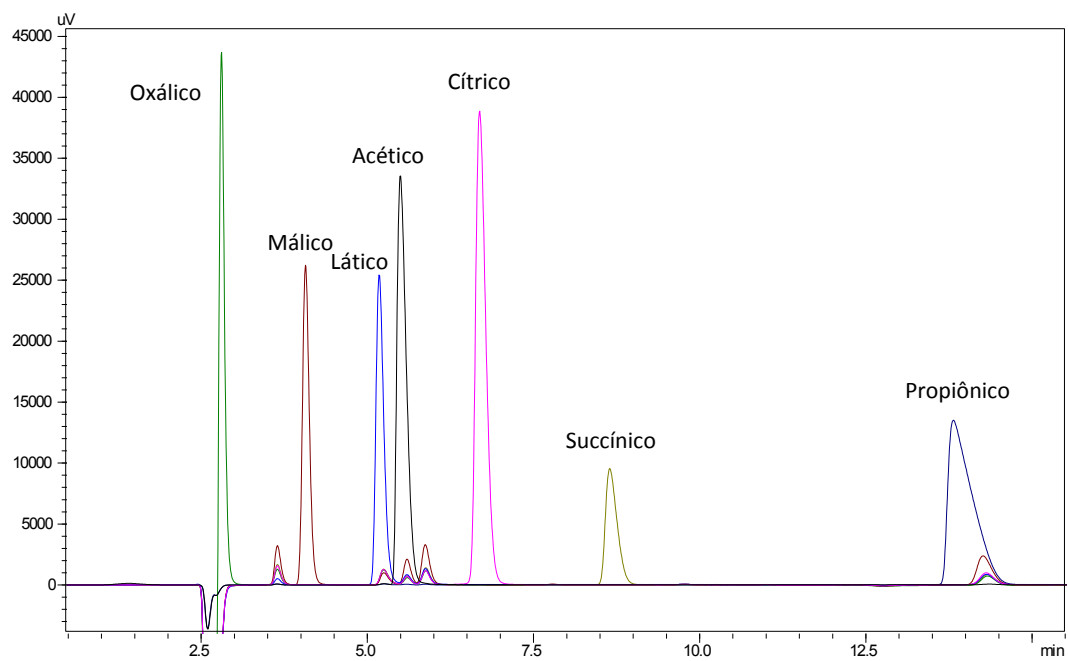
<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Extrato de levedura	5 g
Manitol	25 g
Peptona	3 g
Ágar (0,5%)	5 g

Camada superior:

<b>Componente</b>	<b>Quantidade/L</b>
Extrato de levedura	5 g
Manitol	25 g
Peptona	3 g
Ágar (1,0%)	10 g

## APÊNDICE J

Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos



## APÊNDICE K

Níveis de significância para provadores em função da discriminação das amostras ( $p_{amostra}$ ) para cada atributo

Julgadores	Atributos														
	Aparência					Aroma				Sabor				Textura	
	Cor	Brilho	Transparência	Bolhas	Pontos	Ácido	Doce	Fermentado	Mel	Gosto	Gosto	Sabor	Sabor	Viscosidade	Arenosidade
1	0,2869	0,2560	0,5219	0,1136	0,0515	0,0166	<b>0,9714</b>	0,0009	0,4398	0,0289	0,1359	0,0766	0,3572	0,0228	0,1600
2	<b>0,6162</b>	0,4478	<b>0,6795</b>	0,4444	0,1088	0,2389	0,0116	0,0828	0,0983	0,0492	0,0425	0,0127	0,0006	<b>0,9084</b>	0,4444
3	0,4977	0,4444	0,3305	-	0,0878	0,5603	0,0439	0,1479	<b>0,7591</b>	0,0719	0,5721	0,2863	0,2912	<b>0,8814</b>	0,4444
4	0,2542	<b>0,7656</b>	<b>0,7190</b>	0,1908	0,2139	0,1731	<b>0,8676</b>	0,0894	0,1225	0,1037	<b>0,6240</b>	0,0110	0,1254	<b>0,6104</b>	0,3356
5	0,4143	0,2500	0,4531	-	0,4444	<b>0,8155</b>	<b>0,6136</b>	0,3394	0,5788	0,0938	0,4782	<b>0,6229</b>	<b>0,7741</b>	0,4444	-
6	<b>0,9456</b>	0,2500	0,3990	<b>0,8622</b>	0,2942	0,4685	0,2948	0,2629	<b>0,7511</b>	0,1353	0,2247	0,3138	<b>0,7045</b>	0,5701	0,4444
7	0,2691	<b>0,7307</b>	0,1952	0,2178	0,2491	0,4444	0,4722	<b>0,6313</b>	<b>0,6182</b>	0,3577	<b>0,9228</b>	0,2302	0,4810	<b>0,7014</b>	-
8	0,5662	<b>0,9494</b>	0,3029	-	0,0278	0,4976	0,2660	<b>0,8738</b>	0,0715	0,0114	0,1477	0,0099	0,4110	<b>0,7756</b>	-
9	<b>0,6676</b>	0,0198	<b>0,7901</b>	0,4444	0,2469	0,4617	<b>0,9326</b>	0,5553	0,2052	0,4132	<b>0,6991</b>	<b>0,8446</b>	0,2536	0,4756	0,4444
10	0,2995	0,4967	0,4683	0,0117	0,2519	<b>0,6202</b>	0,0049	0,0520	0,2452	<b>0,6901</b>	0,4357	0,0914	0,5898	<b>0,7595</b>	0,1622
11	0,1267	<b>0,8206</b>	0,5706	0,1600	<b>0,7334</b>	0,1675	<b>0,6155</b>	0,0882	0,6735	0,0582	0,1986	0,2951	0,0118	0,5355	0,4166
12	0,0789	0,1232	0,0067	0,1774	<b>0,7175</b>	0,4858	<b>0,9363</b>	0,4292	0,2520	0,4050	0,1192	0,0022	0,4858	<b>0,9499</b>	0,1350
13	0,4191	0,4835	0,1138	0,3519	0,2391	0,1650	0,0346	0,0849	0,3063	0,3481	0,0356	0,0294	0,0126	0,2974	0,2899
14	0,0122	0,4780	0,3038	0,2137	0,0878	0,1259	<b>0,6439</b>	0,2171	<b>0,7277</b>	0,1260	0,2302	0,1617	<b>0,9518</b>	0,4014	0,0460
15	0,0298	<b>0,6650</b>	0,2510	-	0,2096	<b>0,8586</b>	<b>0,9246</b>	0,0345	<b>0,9102</b>	0,3432	0,4620	0,0008	<b>0,6282</b>	<b>0,8573</b>	0,2371
16	0,2149	<b>1,0000</b>	<b>0,6614</b>	-	0,2245	0,3997	0,4444	0,0691	0,1855	<b>0,7987</b>	0,5289	0,1872	0,2178	<b>0,7028</b>	0,4444

Valores em negrito indicam  $p_{amostra} \geq 0,50$ .

Níveis de significância para provadores em função da repetibilidade ( $p_{\text{repetição}}$ )

Julgadores	Atributos														
	Aparência					Aroma				Sabor				Textura	
	Cor	Brilho	Transparência	Bolhas	Pontos	Ácido	Doce	Fermentado	Mel	Gosto	Gosto	Sabor	Sabor	Viscosidade	Arenosidade
1	0,2587	0,2733	0,1241	0,2469	0,6732	0,0554	0,5741	0,7160	0,8069	0,1349	0,4053	0,1011	0,0760	0,8352	0,4444
2	0,8575	<b>0,0328</b>	0,1648	0,4444	0,7316	0,4389	0,2036	0,0717	0,7418	0,4330	0,3556	<b>0,0406</b>	0,0313	0,3109	0,4444
3	0,7128	0,4444	<b>0,0261</b>	-	0,2844	0,7612	0,1065	<b>0,0191</b>	0,1723	0,5349	0,0850	0,0991	0,1267	0,6667	0,4444
4	0,8890	<b>0,0089</b>	0,2159	0,4444	0,5476	0,1185	0,0868	<b>0,0218</b>	<b>0,0377</b>	0,1328	0,1361	0,4552	0,0727	0,0738	0,4444
5	0,1836	<b>0,0012</b>	0,9856	-	0,4444	0,6568	0,2489	0,9198	0,5701	<b>0,0472</b>	0,4218	0,9507	0,3747	<b>0,0179</b>	-
6	0,8622	0,2500	0,4444	0,8622	0,2844	0,6902	<b>0,0427</b>	0,8913	0,6922	0,4243	0,3086	0,8646	0,6522	0,9588	0,4444
7	0,8251	0,8605	0,7022	0,4444	0,1219	0,4444	0,3539	0,3736	0,6994	0,4927	0,3947	0,5634	0,2889	0,2347	-
8	0,7416	0,0917	0,3774	-	0,0554	<b>0,0356</b>	0,3482	0,0707	0,1175	0,6690	0,2275	0,6000	0,4122	0,2399	-
9	0,7848	<b>0,0001</b>	<b>0,0004</b>	0,4444	0,3478	0,7519	<b>0,0183</b>	0,7048	<b>0,0131</b>	0,2663	<b>0,0346</b>	0,1722	0,0557	<b>0,0003</b>	0,4444
10	0,1978	0,0067	0,0652	0,6709	0,9782	0,7086	0,2485	0,0794	0,1410	0,4304	0,8224	0,0570	0,8856	0,2695	0,4444
11	0,3325	0,4734	0,4470	0,4444	0,1860	0,5419	0,7664	<b>0,0435</b>	0,5320	0,0562	0,4238	0,1508	<b>0,0075</b>	0,0897	0,9856
12	0,2358	0,7264	<b>0,0150</b>	0,0596	0,5066	0,3532	0,6779	0,2258	0,2272	0,2500	0,7058	0,4862	0,4765	0,1789	0,4444
13	0,0568	0,5786	0,5024	0,5201	0,4159	0,0617	0,0599	<b>0,0448</b>	0,2200	0,6622	0,4794	0,1629	0,3344	0,0538	0,4444
14	0,1739	<b>0,0322</b>	0,3815	0,5631	0,3230	0,2716	0,0892	0,7723	<b>0,0396</b>	0,0997	<b>0,0096</b>	0,2545	<b>0,0113</b>	0,7672	0,3205
15	0,6526	0,6650	0,5231	-	0,7010	0,9769	0,9246	0,6514	<b>0,0391</b>	0,9219	0,5440	0,6432	0,5088	<b>0,0002</b>	0,4444
16	0,2026	<b>0,0001</b>	0,9285	-	0,2352	0,8954	0,3768	0,1451	0,9106	0,3401	0,7901	0,1872	0,4444	0,8767	0,4444

Valores em negrito indicam  $p_{\text{repetição}} \leq 0,05$ .

Médias da equipe e de cada julgador para os atributos de cada amostra

Julgador/ Amostra	Atributos														
	Aparência					Aroma				Sabor				Textura	
	Cor	Brilho	Transparência	Bolhas	Pontos	Ácido	Doce	Fermentado	Mel	Gosto	Gosto	Sabor	Sabor	Viscosidade	Arenosidade
1/1	1,13	8,40	8,33	0,33	0,63	1,93	2,30	2,40	3,60	1,20	6,00	2,27	5,90	1,17	0,00
1/2	1,30	8,50	8,47	0,27	0,33	2,07	2,10	4,43	2,33	1,43	6,13	2,53	6,03	0,83	0,00
1/3	2,00	8,47	7,93	0,17	0,17	2,07	2,07	4,97	3,43	1,07	5,43	6,00	4,80	0,93	0,80
1/4	2,00	8,43	8,07	0,30	0,37	1,53	2,00	3,83	1,70	0,97	5,37	4,63	4,97	1,17	0,20
2/1	3,63	8,40	8,40	0,20	0,23	2,03	2,17	2,67	2,83	2,97	3,60	2,00	3,20	0,83	0,00
2/2	4,17	8,40	8,40	0,20	0,13	2,20	2,03	3,77	2,87	3,07	3,27	2,30	3,00	0,97	0,00
2/3	3,97	8,20	8,00	0,03	0,30	2,30	2,30	3,37	3,00	2,73	3,00	2,30	2,87	1,03	0,13
2/4	4,47	8,37	8,17	0,17	0,27	1,97	2,43	3,93	3,17	3,80	3,37	2,77	3,00	1,10	0,17
3/1	2,57	5,30	6,53	0,90	1,07	3,07	5,37	2,97	5,73	1,47	5,83	1,40	6,70	5,53	0,23
3/2	3,63	5,23	5,77	1,17	0,47	2,87	4,60	2,83	6,23	1,67	5,37	1,40	7,27	6,20	0,00
3/3	3,60	4,80	3,73	2,03	0,53	4,63	4,47	3,70	4,13	4,83	4,93	5,33	3,93	5,17	1,23
3/4	4,37	5,03	3,53	0,50	0,37	3,37	4,50	3,53	5,30	4,40	4,23	4,20	4,50	5,13	0,13
4/1	5,00	6,87	5,93	3,57	2,73	4,97	3,13	4,60	3,87	4,57	3,73	3,33	3,90	3,90	0,17
4/2	4,70	6,67	6,07	3,47	1,80	5,07	3,07	4,10	3,80	2,87	5,33	3,00	5,63	4,57	0,00
4/3	5,90	6,57	4,47	5,40	1,30	4,23	3,70	3,23	4,83	4,70	3,90	3,60	4,00	4,73	4,77
4/4	5,50	7,13	5,47	3,23	3,83	4,13	3,87	5,33	4,77	3,70	4,67	4,40	3,83	3,13	2,17
5/1	5,20	8,30	8,33	0,00	1,03	1,50	8,10	1,63	8,13	1,67	8,20	1,47	8,23	2,60	0,00
5/2	5,17	8,10	8,27	0,00	0,07	1,80	7,80	1,53	7,87	2,27	8,40	1,33	8,27	2,63	0,00
5/3	5,20	7,40	6,07	0,00	0,00	2,17	8,23	5,93	8,20	3,83	8,27	7,07	8,17	2,73	1,60
5/4	5,27	7,90	7,23	0,00	0,00	1,77	8,10	5,47	8,00	3,30	8,17	5,97	8,17	3,07	0,37
6/1	1,53	8,50	4,60	0,07	0,07	2,03	1,57	0,73	1,57	2,30	7,60	1,13	1,30	2,73	0,00
6/2	1,47	8,50	5,13	0,00	0,10	3,30	1,27	1,13	2,40	3,20	7,50	0,90	1,67	2,03	0,07
6/3	1,47	8,50	0,97	2,67	0,00	3,53	1,07	5,60	0,93	4,53	4,67	4,73	0,93	2,07	0,83
6/4	2,57	8,50	1,40	0,27	0,00	4,20	1,17	4,90	1,13	5,70	4,83	6,47	1,23	2,57	0,73
7/1	2,53	8,07	8,10	1,50	1,37	5,97	5,70	6,37	6,57	6,70	7,40	6,00	7,13	2,63	0,03
7/2	2,70	8,40	8,33	1,13	0,90	6,30	5,80	5,97	6,37	6,43	7,63	6,43	7,27	2,23	0,07
7/3	2,40	7,73	6,73	0,67	0,40	6,23	5,77	6,10	5,73	6,47	6,87	6,70	7,13	2,80	2,40
7/4	2,77	7,93	7,47	0,23	0,47	6,97	5,47	6,97	6,33	7,50	7,53	6,60	7,37	1,83	1,17

8/1	3,43	<b>3,73</b>	<b>3,70</b>	<b>0,27</b>	<b>0,07</b>	<b>1,57</b>	<b>1,07</b>	<b>1,63</b>	<b>1,17</b>	<b>1,27</b>	<b>3,03</b>	<b>1,73</b>	1,57	<b>3,93</b>	<b>0,00</b>
8/2	2,00	<b>3,57</b>	<b>3,13</b>	<b>0,37</b>	<b>0,10</b>	<b>2,27</b>	<b>1,87</b>	<b>2,00</b>	<b>1,63</b>	<b>1,40</b>	<b>3,07</b>	<b>1,70</b>	2,13	<b>3,70</b>	<b>0,00</b>
8/3	3,90	<b>2,80</b>	<b>2,85</b>	<b>0,15</b>	<b>0,00</b>	<b>2,00</b>	<b>1,00</b>	<b>1,85</b>	<b>1,40</b>	<b>1,65</b>	<b>1,65</b>	<b>2,50</b>	1,40	<b>3,20</b>	<b>0,35</b>
8/4	4,33	<b>3,67</b>	<b>2,33</b>	<b>0,10</b>	<b>0,07</b>	<b>2,20</b>	<b>1,70</b>	<b>2,27</b>	<b>1,03</b>	<b>1,97</b>	<b>1,80</b>	<b>2,67</b>	1,47	<b>4,20</b>	<b>0,10</b>
9/1	<b>5,20</b>	<b>4,00</b>	<b>5,30</b>	<b>0,63</b>	<b>0,17</b>	<b>1,43</b>	2,87	0,70	<b>4,03</b>	0,63	5,47	<b>0,50</b>	<b>5,17</b>	<b>0,87</b>	0,00
9/2	<b>4,87</b>	<b>4,90</b>	<b>4,23</b>	<b>1,60</b>	<b>1,00</b>	<b>0,87</b>	2,77	0,50	<b>3,03</b>	0,60	5,10	<b>0,50</b>	<b>5,13</b>	<b>1,13</b>	0,67
9/3	<b>4,90</b>	<b>4,13</b>	<b>3,37</b>	<b>1,27</b>	<b>0,40</b>	<b>0,83</b>	2,57	2,00	<b>3,30</b>	0,73	1,43	<b>3,67</b>	<b>3,67</b>	<b>0,97</b>	4,80
9/4	<b>5,47</b>	<b>4,90</b>	<b>3,57</b>	<b>0,93</b>	<b>0,73</b>	<b>0,70</b>	1,50	4,57	<b>3,00</b>	0,97	3,07	<b>2,93</b>	<b>3,93</b>	<b>1,60</b>	1,60
10/1	<b>6,37</b>	<b>8,03</b>	7,57	<b>0,53</b>	<b>1,63</b>	<b>2,57</b>	<b>5,47</b>	<b>1,20</b>	<b>6,13</b>	<b>2,77</b>	<b>7,40</b>	5,33	<b>7,27</b>	<b>5,43</b>	<b>0,00</b>
10/2	<b>5,63</b>	<b>7,90</b>	7,93	<b>0,27</b>	<b>2,07</b>	<b>1,87</b>	<b>5,87</b>	<b>1,23</b>	<b>6,00</b>	<b>1,77</b>	<b>7,60</b>	2,30	<b>7,30</b>	<b>6,00</b>	<b>0,00</b>
10/3	<b>6,90</b>	<b>7,40</b>	5,23	<b>2,57</b>	<b>0,23</b>	<b>4,40</b>	<b>6,57</b>	<b>3,63</b>	<b>6,70</b>	<b>6,83</b>	<b>6,53</b>	7,17	<b>7,20</b>	<b>6,60</b>	<b>7,47</b>
10/4	<b>6,23</b>	<b>7,70</b>	7,17	<b>0,20</b>	<b>0,53</b>	<b>2,47</b>	<b>6,07</b>	<b>1,23</b>	<b>6,43</b>	<b>6,77</b>	<b>6,57</b>	5,80	<b>7,13</b>	<b>6,50</b>	<b>3,73</b>
11/1	1,70	7,10	<b>8,17</b>	<b>0,27</b>	<b>0,33</b>	<b>6,90</b>	<b>6,57</b>	4,47	4,73	<b>7,40</b>	<b>7,17</b>	<b>5,17</b>	5,40	<b>0,87</b>	<b>0,00</b>
11/2	1,43	7,40	<b>8,17</b>	<b>0,17</b>	<b>0,43</b>	<b>5,23</b>	<b>6,60</b>	2,53	6,23	<b>5,70</b>	<b>5,63</b>	<b>3,93</b>	6,77	<b>0,73</b>	<b>0,00</b>
11/3	3,30	6,53	<b>1,73</b>	<b>0,57</b>	<b>1,83</b>	<b>6,73</b>	<b>4,17</b>	7,60	3,67	<b>7,30</b>	<b>4,47</b>	<b>7,67</b>	4,87	<b>0,77</b>	<b>3,30</b>
11/4	3,43	6,87	<b>3,77</b>	<b>0,17</b>	<b>0,23</b>	<b>6,47</b>	<b>3,10</b>	7,90	1,90	<b>6,63</b>	<b>4,03</b>	<b>7,97</b>	4,97	<b>0,90</b>	<b>0,73</b>
12/1	<b>1,67</b>	<b>2,20</b>	3,07	<b>0,13</b>	<b>0,23</b>	<b>1,00</b>	<b>3,10</b>	2,10	<b>4,07</b>	<b>0,97</b>	<b>3,20</b>	<b>2,00</b>	<b>4,07</b>	<b>1,00</b>	<b>0,00</b>
12/2	<b>2,00</b>	<b>2,63</b>	4,17	<b>0,03</b>	<b>0,17</b>	<b>1,07</b>	<b>3,07</b>	0,77	<b>3,97</b>	<b>1,03</b>	<b>3,47</b>	<b>0,83</b>	<b>4,30</b>	<b>1,33</b>	<b>0,00</b>
12/3	<b>2,40</b>	<b>2,60</b>	3,20	<b>0,00</b>	<b>0,10</b>	<b>1,60</b>	<b>3,10</b>	1,57	<b>3,80</b>	<b>2,47</b>	<b>3,40</b>	<b>1,63</b>	<b>3,90</b>	<b>1,83</b>	<b>0,67</b>
12/4	<b>3,40</b>	<b>3,43</b>	3,23	<b>0,00</b>	<b>0,57</b>	<b>2,07</b>	<b>2,67</b>	1,87	<b>3,87</b>	<b>2,63</b>	<b>3,10</b>	<b>2,00</b>	<b>4,07</b>	<b>1,60</b>	<b>0,13</b>
13/1	<b>5,13</b>	<b>8,27</b>	<b>5,47</b>	<b>0,07</b>	<b>0,40</b>	<b>7,63</b>	<b>8,40</b>	<b>7,93</b>	<b>8,33</b>	<b>8,13</b>	<b>8,40</b>	<b>7,43</b>	<b>8,37</b>	<b>4,87</b>	0,07
13/2	<b>5,53</b>	<b>8,37</b>	<b>5,47</b>	<b>0,10</b>	<b>0,57</b>	<b>7,43</b>	<b>8,20</b>	<b>8,13</b>	<b>8,27</b>	<b>7,13</b>	<b>8,33</b>	<b>7,73</b>	<b>8,33</b>	<b>5,80</b>	0,10
13/3	<b>6,17</b>	<b>8,27</b>	<b>3,83</b>	<b>2,17</b>	<b>0,30</b>	<b>7,60</b>	<b>8,30</b>	<b>8,13</b>	<b>8,33</b>	<b>6,17</b>	<b>8,20</b>	<b>7,57</b>	<b>8,13</b>	<b>5,13</b>	3,63
13/4	<b>5,80</b>	<b>6,87</b>	<b>5,17</b>	<b>0,67</b>	<b>0,07</b>	<b>7,67</b>	<b>8,33</b>	<b>8,13</b>	<b>8,40</b>	<b>7,73</b>	<b>8,43</b>	<b>7,60</b>	<b>8,10</b>	<b>4,70</b>	1,03
Média da equipe	3,47 <sup>2</sup>	6,71 <sup>3</sup>	6,42 <sup>3</sup>	0,65 <sup>2</sup>	0,77 <sup>4</sup>	3,28 <sup>2</sup>	4,29 <sup>4</sup>	3,03 <sup>2</sup>	4,67 <sup>3</sup>	3,23 <sup>2</sup>	5,93 <sup>4</sup>	3,06 <sup>2</sup>	5,25 <sup>3</sup>	2,80 <sup>1</sup>	0,04 <sup>1</sup>
	3,43 <sup>1</sup>	6,81 <sup>4</sup>	6,43 <sup>4</sup>	0,67 <sup>3</sup>	0,63 <sup>3</sup>	3,26 <sup>1</sup>	4,23 <sup>3</sup>	2,99 <sup>1</sup>	4,69 <sup>4</sup>	2,97 <sup>1</sup>	5,91 <sup>3</sup>	2,68 <sup>1</sup>	5,62 <sup>4</sup>	2,94 <sup>4</sup>	0,07 <sup>2</sup>
	4,01 <sup>3</sup>	6,42 <sup>1</sup>	4,47 <sup>1</sup>	1,36 <sup>4</sup>	0,43 <sup>1</sup>	3,72 <sup>4</sup>	4,10 <sup>2</sup>	4,44 <sup>3</sup>	4,42 <sup>2</sup>	4,10 <sup>3</sup>	4,83 <sup>1</sup>	5,07 <sup>4</sup>	4,69 <sup>1</sup>	2,92 <sup>3</sup>	2,46 <sup>4</sup>
	4,28 <sup>4</sup>	6,67 <sup>2</sup>	5,12 <sup>2</sup>	0,52 <sup>1</sup>	0,58 <sup>2</sup>	3,50 <sup>3</sup>	3,92 <sup>1</sup>	4,61 <sup>4</sup>	4,23 <sup>1</sup>	4,31 <sup>4</sup>	5,01 <sup>2</sup>	4,92 <sup>3</sup>	4,83 <sup>2</sup>	2,88 <sup>2</sup>	0,94 <sup>3</sup>

Valores em negrito indicam discordância com a ordem das médias da equipe.

Amostra 1: Congelada

Amostra 2: Pasteurizada

Amostra 3: Maturada a 20±5°C

Amostra 4: Maturada a 30±5°C

## APÊNDICE L

Teores dos compostos identificados pela técnica de ressonância magnética nuclear

	Etanol (mg/mL)	Ácido Láctico (mg/mL)	Glicose (mg/mL)	Sacarose (mg/mL)
<b>Tempo Inicial</b>	1,09	2,32	277,89	2,87
<b>Pasteurizada</b>	1,16	2,43	650,53	5,64
<b>Congelada</b>	0,6	2,55	135,69	1,53
<b>M1 15d</b>	0,47	2,05	134,18	1,04
<b>M1 30d</b>	1,6	2,12	209,88	1,71
<b>M1 45d</b>	0,89	2,07	104,82	0,82
<b>M1 60d</b>	2,05	2,16	109,93	1,03
<b>M1 75d</b>	1,5	2,09	111,2	0,97
<b>M1 90d</b>	3,36	2,13	212,48	1,68
<b>M1 105d</b>	2,35	1,98	92,13	0,78
<b>M1 120d</b>	4,25	2,56	126,2	0,4
<b>M1 135d</b>	2,2	2,06	81,55	0,66
<b>M1 150d</b>	4,44	2	149,51	1,44
<b>M1 165d</b>	3,2	2,11	97,23	0,77
<b>M1 180d</b>	2,62	1,89	74,83	0,67
<b>M2 15d</b>	0,93	2,13	152,22	1,25
<b>M2 30d</b>	0,45	1,85	58,05	0,52
<b>M2 45d</b>	1,76	2,05	214,64	1,81
<b>M2 60d</b>	2,83	2,01	133,32	1,08
<b>M2 75d</b>	3,39	2,14	152,12	1,55
<b>M2 90d</b>	0,56	1,88	25,79	0,25
<b>M2 105d</b>	4,49	2,07	158,29	1,68
<b>M2 120d</b>	3,05	2,12	101,21	1,07
<b>M2 135d</b>	16,45	1,94	555,42	5,84
<b>M2 150d</b>	19,45	2,05	682,22	7,16
<b>M2 165d</b>	2,98	2,1	69,67	0,76
<b>M2 180d</b>	4,06	1,96	98,17	1,01