



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RAQUEL NUNES ALMEIDA DA SILVA

**BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO MEL E AO PÓLEN DAS ABELHAS SEM
FERRÃO: Identificação por espectrometria de massa MALDI-
TOF MS**

UFBA

SALVADOR

2022



RAQUEL NUNES ALMEIDA DA SILVA

**BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS CULTIVÁVEIS
ASSOCIADAS AO MEL E AO PÓLEN DAS ABELHAS SEM
FERRÃO: Identificação por espectrometria de massa MALDI-
TOF MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PGAli) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez

Orientador

Prof.^a Dr.^a Karina Teixeira Magalhães Guedes

Prof.^a Dr.^a Cassiane da Silva Oliveira Nunes

Coorientadoras

SALVADOR

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

RAQUEL NUNES ALMEIDA DA SILVA

BIODIVERSIDADE DE LEVEDURAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADAS AO MEL E AO PÓLEN DAS ABELHAS SEM FERRÃO: Identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF MS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 14 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. MARCELO ANDRÉS UMSZA GUEZ (ORIENTADOR)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Dr. LETÍCIA DE ALENCAR PEREIRA RODRIGUES (EXAMINADORA)
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI, BA)

Dr. RICARDO WAGNER DIAS PORTELA (EXAMINADOR)
Universidade Federal da Bahia (UFBA, BA)

Silva, Raquel Nunes Almeida da.

Biodiversidade de leveduras cultiváveis associadas ao mel e ao pólen das abelhas sem ferrão: identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF MS / Raquel Nunes Almeida da Silva. - 2022.

96 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez.

Coorientadora: Profa. Dra. Karina Teixeira Magalhães Guedes.

Coorientadora: Profa. Dra. Cassiane da Silva Oliveira Nunes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2022.

1. Alimentos - Análise. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. Abelhas sem ferrão - Produtos. 4. Abelhas sem ferrão - Pólen. 5. Abelhas sem ferrão - Mel. 6. Leveduras. I. Umsza Guez, Marcelo Andrés. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 595.799

CDU - 595.799

Dedico este trabalho,

Á minha amiga Susana Gesteira, por todo apoio, incentivo e por sempre acreditar no meu potencial.

Meus agradecimentos,

À Deus, por me presentear com a vida; por estar comigo em todos os momentos, me guiando, me dando sabedoria, me encorajando e me tornando mais forte para cada obstáculo. Obrigada, Pai! Pelos planos que traçou para minha vida. Eles sempre serão melhores que os meus;

À minha mãe, Rosineide Nunes, pelo cuidado e apoio incondicional, por me educar, e por muitas vezes abdicar dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus;

Ao meu orientador, professor Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez, por me orientar neste projeto, pela confiança depositada e pelos ensinamentos;

Às minhas coorientadoras as quais tenho grande admiração; professora Dr.^a Karina Teixeira Magalhães Guedes e a professora Dr.^a Cassiane da Silva Oliveira Nunes (idealizadora do projeto); obrigada pela confiança, paciência, dedicação, e por compartilhar o conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao professor Dr. Rogério Marcos de Oliveira Alves, por compartilhar seu conhecimento sobre as abelhas sem ferrão e por disponibilizar as amostras necessárias para a condução deste estudo;

À Dr.^a Angélica Cristina de Souza da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por contribuir com a identificação das espécies de leveduras;

Ao meu namorado, Rovilson Bomfim, pelo carinho, incentivo, apoio e compreensão;

Aos meus familiares e amigos que estiverem comigo nesta trajetória, por vibrarem com as minhas conquistas e com cada etapa finalizada. Agradeço em especial a minha amiga Susana, pela amizade, por me incentivar a fazer o mestrado, por me confortar nos momentos mais difíceis, e por sempre me lembrar do meu potencial;

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pela oportunidade do mestrado em Ciência de Alimentos. E a todos os que contribuíram direta ou indiretamente, citados aqui ou não, para a realização deste trabalho;

Muito obrigada!

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu.”
(Ecl. 3.11).*

RESUMO

Existem mais de 500 espécies e 61 gêneros de abelhas sem ferrão conhecidos mundialmente, distribuídas na América tropical, África, sudeste da Ásia e Austrália. Os meliponíneos armazenam alimentos (pólen e néctar) em potes, visando garantir a sobrevivência da colônia durante eventos de escassez de recursos. O pólen é a principal fonte de proteínas, lipídios e vitaminas para as abelhas; o néctar representa a principal fonte de carboidratos. As características sensoriais, físicas e químicas do mel e do pólen das abelhas sem ferrão são bem distintas quando comparadas ao produzido por abelhas *Apis mellífera*. Os dados obtidos com a Revisão de Literatura mostram que o mel de meliponíneos possui alto teor de umidade que varia de 23 a 37,5 %; acidez total 19,9 a 98,43 meq kg⁻¹; e açúcares redutores 43 a 75,5 %. O pólen possui alto teor de umidade variando de 37,12 a 53,93 %; proteínas 19,7 a 37,63%; lipídeos 2,5 a 10,81 %; e fibras de 9,3 a 13,65 %. As bactérias mais associadas às abelhas sem ferrão são *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Fructobacillus*, *Lysinibacillus* e *Neisseria*. As leveduras mais observadas no mel são *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kloeckera* e *Pichia*. E os fungos filamentosos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces*. No pólen pode-se observar a presença de bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Bacillus*; leveduras como *Starmerella* e *Zygosaccharomyces osmophilus*, e os fungos *Penicillium* e *Talaromyces*. O estudo sobre a diversidade de leveduras em amostras de mel e pólen de abelhas sem ferrão no estado da Bahia: Uso da técnica MALDI-TOF identificou nove espécies de leveduras foram encontradas neste estudo: *Candida maltosa*, *Candida norvegica*, *Kazachstania telluris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida shehatae* var. *insectosa*, *Candida guilliermondii*, *Brettanomyces bruxelensis*, *Kazachstania exigua*, *Candida lactis-condensi* associadas ao mel e ao pólen das abelhas *Melipona scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornes* e *Tetragonisca angustula*. O desenvolvimento de novas pesquisas sobre as características físico-químicas do mel e do pólen de abelhas sem ferrão pode contribuir para a construção de legislação específica que define o padrão de identidade e qualidade destes produtos; a identificação de novas espécies contribui com o conhecimento de novas espécies associadas aos produtos, bem como para aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: *Abelhas sem ferrão. Mel. Pólen. Parâmetros físico-químicos. Qualidade microbiológica. Leveduras.*

ABSTRACT

There are more than 500 species and 61 genera of stingless bees known worldwide, distributed in tropical America, Africa, Southeast Asia and Australia. Meliponines store food (pollen and nectar) in pots, aiming to ensure the survival of the colony during resource scarcity events. Pollen is the main source of proteins, lipids and vitamins for bees; nectar represents the main source of carbohydrates. The sensory, physical and chemical characteristics of honey and pollen from stingless bees are quite different when compared to that produced by *Apis mellifera* bees. The data obtained from the Literature Review show that meliponine honey has a high moisture content ranging from 23 to 37,5%; total acidity 19,9 to 98,43 meq kg⁻¹; and reducing sugars 43 to 75,5%. The pollen has a high moisture content ranging from 37,12 to 53,93%; proteins 19,7 to 37,63%; lipids 2,5 to 10,81%; and fiber from 9,3 to 13,65%. The bacteria most associated with stingless bees are *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Fructobacillus*, *Lysinibacillus* and *Neisseria*. The most common yeasts observed in honey are *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kloeckera* and *Pichia*. And the fungal filaments *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. In pollen, the presence of bacteria such as *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Bacillus* can be observed; yeasts such as *Starmerella* and *Zygosaccharomyces osmophilus*, and the fungi *Penicillium* and *Talaromyces*. The study on the diversity of yeasts in samples of honey and pollen from stingless bees in the state of Bahia: Use of the MALDI-TOF technique identified nine species of yeasts that were found in this study: *Candida maltosa*, *Candida norvegica*, *Kazachstania telluris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida shehatae* var. *insectosa*, *Candida guilliermondii*, *Brettanomyces bruxelensis*, *Kazachstania exigua*, *Candida lactis-condensi* associated with honey and bee pollen *Melipona scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornes* and *Tetragonisca angustula*. The development of new research on the physicochemical characteristics of honey and pollen from stingless bees can contribute to the construction of specific legislation that defines the identity and quality standards of these products; the identification of new species contributes to the knowledge of new species associated with products, as well as for biotechnological application.

Keywords: *Stingless bee. Honey. Pollen. Physical-chemical parameters. Microbiological quality. Yeasts.*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1** - As espécies de abelhas *Melipona scutellaris* (Uruçu) (A), *Nannotrigona testaceicornes* (Iraí) (B) e *Tetragonisca angustula* (Jataí) (C)..... 19
- Figura 2** - Colônia de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) (A), pote de mel (B), pote de pólen (C)..... 20
- Figura 3** - Princípios do funcionamento da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/ dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS)..... 41

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Localização geográfica das amostras de mel/pólen coletadas em São Gonçalo dos Campos - Bahia..... 69
- Figura 2** - Quantificação em log UFC/g g⁻¹ das espécies de leveduras identificadas em amostras de pólen de acordo com as diferentes espécies de abelhas sem ferrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em P < 0,05 pelo teste de Tukey.... 74
- Figura 3** - Quantificação em log UFC/g⁻¹ de espécies de leveduras identificadas em amostras de mel de acordo com diferentes espécies de abelhas sem ferrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas em P < 0,05 pelo teste de Tukey..... 77
- Figura 4** - Análise de agrupamento dos principais espectros de massa (MSPs) MALDI-TOF de cepas de referência CBS de nove espécies de leveduras identificadas. O nível de distância da subdivisão é exibido em unidades relativas..... 82

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** - Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas nas diferentes regiões do Brasil..... 18
- Tabela 2** - Especificações das normas brasileira e internacional para o controle de qualidade de mel de abelha *Apis mellifera*. Fonte: Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (Brasil, 2000) e *Codex Alimentarius* (2020)..... 23
- Tabela 3** - Especificação das características físico-químicas para o controle de qualidade e identidade de diferentes méis de abelhas sem ferrão. A.T = Acidez Total; S.A = Sacarose Aparente; A.R = Açúcares Redutores; A.D = Atividade Diastásica; HMF = Hidroximetilfurfural (-) ausência do parâmetro no estudo..... 24
- Tabela 4** - Características físico-químicas do pólen apícola estabelecidas pela legislação brasileira, e resultados obtidos por estudos conduzidos com pólen de abelhas sem ferrão. Fonte da legislação brasileira: Instrução Normativa Nº 03, de 19 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola. Resultados obtidos por Alves et al. (2018), Rebelo et al. (2016) e Ferreira-Caliman (2012) para pólen coletados por diferentes espécies de abelhas sem ferrão..... 31

CAPÍTULO II

- Tabela 1** - Diversidade de espécies de leveduras identificadas em amostras de mel/pólen de acordo com diferentes meios de cultura pela técnica Maldi-Tof/Genbank..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MALDI-TOF MS - *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*

MD - Mel Desumidificado

MR - Mel Refrigerado

A.T - Acidez Total

S.A - Sacarose Aparente

A.R - Açúcares Redutores

A.D - Atividade Diastásica

HMF - Hidroximetilfurfural

pH - potencial hidrogeniônico

Aw - Atividade de água

NMP - Número Mais Provável

UFC - Unidade Formadora de Colônia

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

AFLP - Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos

PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

RAPD - Análise de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

rRNA - RNA ribossômico

rDNA - DNA ribossômico

MBL - MALDI Biotyper

YEPD - Ágar Extrato de Levedura Peptona Dextrose

YM - Ágar Extrato de Malte

SDA - Ágar Sabouraud Dextrose

RPM - Rotação por minuto

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO I - Biodiversidade de leveduras cultiváveis associadas ao mel e ao pólen das abelhas sem ferrão: identificação por espectrometria de massa maldi-tof ms.....</i>	14
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 Abelha sem ferrão e seus produtos.....	18
3.2 Mel de abelha sem ferrão.....	21
3.2.1 Parâmetros de identidade e qualidade do mel de abelha sem ferrão.....	22
3.2.1.1 Açúcares.....	25
3.2.1.2 Umidade.....	25
3.2.1.3 Acidez.....	26
3.2.1.4 Atividade Diastásica.....	26
3.2.1.5 Hidroximetilfurfural (HMF).....	27
3.2.2 Qualidade microbiológica de mel de abelha sem ferrão.....	27
3.3 Pólen de abelha sem ferrão.....	30
3.3.1 Características físico-químicas do pólen de abelha sem ferrão.....	30
3.3.2 Qualidade microbiológica de pólen de abelha sem ferrão.....	32
3.4 Leveduras e interação com as abelhas sem ferrão.....	33
3.5 Identificação das leveduras: MALDI-TOF.....	38
4 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	44
<i>CAPÍTULO II - Diversidade de leveduras em amostras de mel/pólen de abelhas sem ferrão no estado da Bahia-Brasil: Uso da técnica Maldi-Tof/Genbank.....</i>	61

Capítulo I

Biodiversidade de leveduras cultiváveis associadas ao mel e ao pólen das abelhas sem ferrão: identificação por espectrometria de massa maldi-tof ms

1 INTRODUÇÃO GERAL

As abelhas pertencentes à ordem *Hymenoptera*, família *Apidae*, subfamília *Apinae* e tribo *Meliponini*, são popularmente conhecidas como abelhas sem ferrão por possuírem acúleo atrofiado e, portanto, incapazes de ferroad. O grupo abrange mais de 500 espécies e 61 gêneros conhecidos mundialmente, distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais (América tropical, África, sudeste da Ásia e Austrália) (HRNCIR; JARAU; BARTH, 2016; SOUZA; MENEZES; FLACH, 2021). O Brasil abriga grande diversidade dessas espécies, sendo 244 identificadas, pertencentes a 29 gêneros diferentes, 50 % dessas espécies são endêmicas da Mata Atlântica. Estas abelhas, além de exercerem papel socioeconômico importante, também contribuem diretamente para a estruturação ecológica dos ecossistemas em que estão inseridos (PEDRO, 2014).

Os meliponíneos formam colônias perenes onde armazenam alimentos (pólen e néctar) por longos períodos, visando garantir a sobrevivência da colônia durante eventos de escassez de recursos, e realizando transferência de materiais do ninho mãe para o recém-fundado (MICHENER, 2013; MELO GAR, 2020).

O pólen e o néctar são recursos importantes para a colônia, sendo o pólen a principal fonte de proteína, lipídios e vitaminas para as abelhas, e o néctar a principal fonte de carboidratos (MICHENER, 1974; MAIA SILVA *et al.*, 2015). Eles são armazenados separadamente em potes de cera construídos pelas próprias abelhas (VILLAS BÔAS, 2018).

O pólen é armazenado na colônia dentro dos potes de cerume, sendo processado pelas abelhas que depositam nele néctar e algumas secreções ricas em enzimas, juntamente com microrganismos. Após, os potes são vedados com cera, tornando o ambiente propício para a fermentação que transforma o pólen coletado em um novo produto conhecido como samburá, o qual é rico em nutrientes essenciais para a sobrevivência da colônia (NOGUEIRA NETO, 1997; VILLAS BÔAS, 2018).

O néctar das flores é transportado através da vesícula melífera (papo de mel), uma espécie de bolsa onde o néctar recebe algumas enzimas provenientes das glândulas do abdômen e das glândulas cefálicas; este néctar começa a ser processado, e posteriormente dentro da colônia este produto é armazenado, maturado e transformado em mel (SIMONE FINSTROM; SPIVAK, 2010; ELIAS SANTOS *et al.*, 2013; CHUTTONG *et al.*, 2016).

O interior dos ninhos dessas abelhas torna-se um ambiente anaeróbico quando completamente cheio e fechado com cerúmen. A composição do mel e do pólen produzidos pelas abelhas, somados à alta umidade do ambiente, tem favorecido as interações e

desenvolvimento microbianos. Estas interações podem ser observadas dentro dos ninhos de abelhas, os quais abrigam uma microbiota diversificada, composta de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (PAULA *et al.*, 2021).

Os microrganismos podem interagir com as abelhas por simbiose, contribuir na nutrição das abelhas, produzir biomoléculas que auxiliam na transformação de produtos como o néctar e o pólen, e até mesmo quebrar moléculas que a abelha é incapaz de digerir. Algumas espécies podem atuar produzindo toxinas e/ou compostos antimicrobianos que têm a finalidade de inibir o crescimento de patógenos (PAULA *et al.*, 2021, MENEZES *et al.*, 2013; DOUGLAS, 2015; STEFANINI, 2018).

A microbiota associada ao pólen e o mel das abelhas *Meliponini* ainda é pouco estudada, assim como as informações sobre o envolvimento das leveduras na transformação bioquímica desses produtos. No entanto, a presença destes microrganismos pode ser percebida por meio da fermentação destes alimentos que são armazenados dentro das colônias. O ambiente no interior do ninho funciona como um biorreator natural, a composição do substrato propicia condições favoráveis para o crescimento de leveduras e outros microrganismos com potencial biotecnológico (KWONG *et al.*, 2017; MEIRELES, 2018).

Os principais métodos utilizados para identificação de microrganismos incluem métodos tradicionais, os de biologia molecular e a espectrometria de massa (PERANTONI; QUEIROZFERNANDES, 2019). A espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF MS) do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* é uma técnica baseada na comparação da impressão digital das proteínas obtidas das células microbianas e que tem demonstrado alta potencialidade na identificação de leveduras (PASSARINI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2015). Diante do exposto, o Capítulo I objetivou apresentar uma Revisão de Literatura acerca dos aspectos relacionados às abelhas sem ferrão e às características físico-químicas e microbiológicas do mel e do pólen; a interação de bactérias, fungos e leveduras; e o método da espectrometria de massa MALDI-TOF. O Capítulo II objetivou identificar por espectrometria de massa MALDI-TOF a biodiversidade de leveduras associadas ao mel e ao pólen das espécies *Melipona scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornes* e *Tetragonisca angustula*, na região de São Gonçalo dos Campos-BA.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Identificar a biodiversidade de leveduras cultiváveis associadas ao mel e ao pólen das abelhas sem ferrão *Melipona scutellaris*, *Nannotrigona testaceicornes* e *Tetragonisca angustula* da região de São Gonçalo dos Campos, Bahia.

2.2 Objetivos específicos

- Apresentar de forma breve os aspectos relacionados às abelhas sem ferrão, o mel, o pólen e as interações das leveduras com estes insetos e tais produtos;
- Explicar a finalidade do método da espectrometria de massa;
- Isolar as leveduras presentes no mel e no pólen das três espécies;
- Identificar as leveduras por meio da espectrometria de massas MALDI-TOF;
- Estabelecer uma biblioteca suplementar de leveduras associadas ao mel e ao pólen de diferentes espécies de abelhas sem ferrão para posterior aplicação em processos biotecnológico.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Abelha sem ferrão

As abelhas sem ferrão pertencem à ordem *Hymenoptera*, família *Apidae*, subfamília *Apinae*, tribo *Meliponini* são popularmente denominadas “abelhas sem ferrão” por possuírem uma forma atrofiada do ferrão, sendo incapazes de ferroar. Elas constituem um grupo formado por mais de 550 espécies conhecidas mundialmente, sendo encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e Central, na África, no sudoeste Asiático e na Austrália (MICHENER, 2013; CAMARGO; PEDRO, 2013; VILLA BÔAS, 2018).

O Brasil possui grande diversidade de espécies (Tabela 1), sendo registradas 242 espécies e 29 gêneros, totalizando 23 % das espécies de melíponas conhecidas; destacando a região nordeste como a de maior portadora das espécies (MICHENER, 2013; CAMARGO; PEDRO, 2013; VIANA *et al.*, 2013). Dentre as várias espécies existentes no país, estão as *Melipona scutellaris* (Uruçu), *Nannotrigona testaceicornes* (Iraí) e *Tetragonisca angustula* (Jataí), que foram selecionadas para a coleta do mel e do pólen utilizados para este estudo.

Tabela 1 - Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas nas diferentes regiões do Brasil.

Norte	<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaíra, Jandaíra-Preta
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-Cinzenta
	<i>Melipona ebúrnea</i>	Uruçu-Beijo
	<i>Melipona flavolineata</i>	Uruçu-Amarela
	<i>Melipona fulva</i>	Uruçu-Amarela
	<i>Melipona melanoventer</i>	Uruçu-da-Bunda-Preta
	<i>Melipona paraenses</i>	Uruçu-Boca-de-Ralo
	<i>Scaptotrigona nigrohirta</i>	Canudo
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra-Amarela
	<i>Scaptotrigona polysticta</i>	Andorinha, Benjoi
	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Tubi
Nordeste	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba
	<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu-Verdadeira
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu
	<i>Scaptotrigona tubiba</i>	Tubi
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí
Centro-Oeste	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiuba, Jandaíra-Preta
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu
	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Iraí
	<i>Scaptotrigona nigrohirta</i>	Canudo

	<i>Scaptotrigona polysticta</i>	Andorinha, Benjoi
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí
Sudeste	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo
	<i>Cephalotrigona capitata</i>	Mombucão
	<i>Melipona capixaba</i>	Uruçu-Capixaba
	<i>Melipona marginata</i>	Manduri
	<i>Melipona mondury</i>	Uruçu-Amarela
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí
	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Iraí
	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Tubuna
	<i>Scaptotrigona depilis</i>	Canudo
Sul	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo
	<i>Cephalotrigona capitata</i>	Mombucão
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia
	<i>Melipona obscurior</i>	Manduri
	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Iraí
	<i>Melipona mondury</i>	Bugia, Tujuba
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí
	<i>Plebeia saiqui</i>	Mirim-Saiqui
	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Tubuna
	<i>Scaptotrigona depilis</i>	Canudo

Fonte: Adaptado de VILLAS BÔAS, 2018.

A Uruçu é a principal abelha do gênero *Melipona* domesticada no Nordeste, isso se deve por serem excelentes produtoras de mel e pólen (SILVA; PAZ, 2012), elas diferem das demais espécies principalmente por serem maiores (CARVALHO; ZANELLA, 2017). A Iraí e Jataí produzem produtos de excelente qualidade, porém são de pequeno porte e produzem em menor quantidade (Figura 1) (VIANA *et al.*, 2013; VILLAS BÔAS, 2018).

Figura 1 - As espécies de abelhas *Melipona scutellaris* (Uruçu) (A), *Nannotrigona testaceicornis* (Iraí) (B) e *Tetragonisca angustula* (Jataí) (C).



Fonte: Associação Brasileira de Estudos das Abelhas (2021).

As abelhas sem ferrão vivem em colônias constituídas por muitas operárias, que realizam trabalhos cooperativos com alto grau de organização para construção da estrutura e funcionamento das colônias. As operárias trabalham coletando e processando o alimento, além de protegerem as crias (HRNCIR, JARAU; BARTH, 2016; SILVA *et al.*, 2014); a rainha é responsável pela postura de ovos que dão origem aos outros indivíduos da colônia, também é responsável pela organização da colônia realizada pela comunicação através de feromônios produzidos nas suas glândulas mandibulares (VILLAS BÔAS, 2018).

Para resistir por longos períodos de adversidades e proteger sua prole, as abelhas sem ferrão armazenam alimentos em potes localizados dentro da colônia (MICHENER, 1969; WILLE, 1983; MICHENER, 2013). O armazenamento por longos períodos e as condições em que estes alimentos estão armazenados, podem favorecer inúmeras interações microbianas (PAULA *et al.*, 2021).

As colônias são constituídas por dois elementos principais: os potes de alimentos (mel e pólen), o ninho (favos de cria) (Figura 2), além de estruturas auxiliares, como o invólucro, o batume, túnel de ingresso (VENTURIERI, 2008).

Figura 2 - Colônia de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*) (A), pote de mel (B), pote de pólen (C).



Fonte: TOUFALIA *et al.*, 2016.

Os potes de alimentos são estruturas de cera construídas pelas próprias abelhas para armazenar o mel e o pólen, estes potes geralmente possuem formato circular ou oval, e podem apresentar formatos variados conforme a espécie. O pólen e mel são armazenados separadamente nestes potes. Dessa forma, em uma colônia de abelhas sem ferrão, pode-se

encontrar dois tipos de potes de alimento: potes de pólen e potes de mel (VILLAS BÔAS, 2018).

Já o ninho é construído por diversos materiais que são coletados pelas abelhas, como barro, argila, resinas, e outros são produzidos ou processados dentro da colônia, como a cera, o cerume e o geoprópolis (NOGUEIRA NETO, 1997; BALLIVIÁN *et al.*, 2008) e tem a finalidade de proteger os ovos depositados pela rainha que dará origem a uma nova abelha (FREITAS, 2003).

As abelhas sem ferrão além de exercerem papel socioeconômico importante, visto que a comercialização do seu mel é considerada um meio de renda complementar para pequenos e médios apicultores. Elas também contribuem diretamente na estruturação ecológica dos ecossistemas em que estão inseridos, são importantes propagadoras da polinização de diversas culturas agrícolas e para a reprodução sexual das plantas, garantindo uma grande variedade genética dos vegetais e frutos de boa qualidade (PEDRO, 2014; CHUTTONG *et al.*, 2016; COSTA *et al.*, 2017).

3.2 Mel de abelha sem ferrão

O néctar proveniente das flores e/ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas é coletado pelas abelhas e recebe algumas substâncias específicas como as enzimas presentes nas secreções salivares das glândulas do abdômen e de glândulas cefálicas das abelhas. Este néctar é processado, e posteriormente armazenado e maturado dentro dos potes na colônia, transformando-se em mel (ELIAS SANTOS *et al.*, 2013; CHUTTONG *et al.*, 2016). O néctar é um recurso importante para a nutrição das abelhas, sendo a principal fonte de carboidratos (MAIA SILVA *et al.*, 2015).

Segundo a portaria ADAB nº 207 de 21/11/2014, mel de abelha social sem ferrão é definido o produto alimentício produzido por essas abelhas, a partir do néctar de plantas ou de secreções de partes vivas de plantas ou secreções de insetos sugadores de plantas sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias que elas próprias produzem, armazenam e deixam maturar nos potes das colônias.

O mel é uma solução viscosa composta basicamente por 80 a 85 % de açúcares (frutose e glicose); água (15 a 17 %); minerais (0,2 %) e quantidades menores de proteínas e aminoácidos (0,1 a 0,4 %), enzimas lipídeos, minerais, componentes aromáticos, vitaminas, pigmentos (carotenoides), compostos fenólicos e fotoquímicos (ALQARNI *et al.*, 2014).

A origem botânica e geográfica do néctar está relacionada com a composição química, cor, aroma e sabor do mel. De acordo com a origem botânica e geográfica do néctar, o mel

pode ser classificado em floral (obtido através dos néctares das flores), podendo ser uniflorais ou monoflorais, por ser originário de flores de uma mesma família, gênero ou espécie. Ou multiflorais (obtido através de diferentes origens florais). Também pode ser categorizado como mel de néctar (obtido através do néctar das plantas), ou em mel de melada (obtido das excreções de insetos sugadores de plantas ou de secreções provenientes das partes vivas das plantas) (BELAY *et al.*, 2017; CAMARGO *et al.*, 2017).

O mel produzido por meliponíneos possui características sensoriais, físicas e químicas muito distintas quando comparados ao produzido pela abelha *Apis*, diferem na cor, sabor e viscosidade; é conhecido pelo alto teor de umidade (mais fluídos), pela doçura peculiar, pelo sabor mais ácido, por cristalizarem mais lentamente; também possui microrganismos (bactérias e leveduras) que induzem sua fermentação, além de possuírem maior atividade antioxidante (ALMEIDA MURADIAN *et al.*, 2014; BILUCA *et al.*, 2016; RAO *et al.*, 2016; ÁVILA *et al.*, 2018; VILLAS BÔAS, 2018).

3.2.1 Parâmetros de identidade e qualidade do mel de abelha sem ferrão

A legislação preconiza o padrão para análises físico-químicas quanto ao controle de qualidade do mel puro de *Apis mellifera*, este estabelece os seguintes parâmetros: maturidade (açúcares redutores, umidade, sacarose aparente); pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas, pólen); e deterioração (acidez livre, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000).

No Brasil, a legislação que estabelece os padrões de qualidade do mel para consumo humano é a Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), a qual fixa padrões de identidade e qualidade para méis de abelhas *Apis*, assim como a do *Codex Alimentarius* (2020), que estabelece normas para méis internacionais. No entanto, a portaria ADAB nº 207 de 21/11/2014 aprovou o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelha social sem ferrão do gênero *Melipona* no estado da Bahia, que estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve cumprir o mel de abelha social sem ferrão do gênero *Melipona* submetido ao processo de conservação por desumidificação ou refrigeração e destinado ao consumo humano direto. Estes parâmetros de qualidade físico-química do mel podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2 - Especificações das normas brasileira e internacional para o controle de qualidade de mel de abelha *Apis mellifera*. Fonte: Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (Brasil, 2000) e *Codex Alimentarius* (2020).

Parâmetros	Norma Brasileira, Nº 11, (BRASIL, 2000)	<i>Codex Alimentarius, 2020</i>
Umidade (%)	Máx. 20	Máx. 20
Acidez total (meq kg ⁻¹)	Máx. 50	Máx. 50
Sacarose aparente (%)	Máx. 6,0	Máx. 10
Açúcares redutores (%)	Min. 65	Min. 60
Cinzas (%)	Máx. 0,6	–
Sólidos insolúveis (%)	Máx. 0,1	Máx. 0,1
Hidroximetilfurfural (mg kg ⁻¹)	Máx. 60	Máx. 60
Atividade diastásica (°Gothe)	Min. 8	Min. 8

Para Villas Bôas (2018) torna-se complexo estabelecer para todo um país um único padrão de qualidade para estes méis, visto que o Brasil, por exemplo, dispõe de grande diversidade de espécies de abelhas e de vegetação. Também, a utilização generalizada dos parâmetros físico-químicos estabelecidos para o mel de abelhas *Apis* pode acarretar problemas para comercialização dos méis de espécies sem ferrão, pois os mesmos possuem características físico-químicas muito variadas (Alves *et al.*, 2005). Os dados apresentados na Tabela 2 mostram que o mel de meliponíneos possui composição físico-química distinta dos méis *Apis mellifera*, possuindo alto teor de umidade, variando de 23 a 37,5 %, acidez total de 19,9 a 98,43 meq kg⁻¹, e açúcares redutores de 43 a 75,5 % quando comparado aos padrões estabelecidos para abelhas *Apis mellifera*. As características físico-químicas do mel também podem variar entre diferentes espécies de abelhas sem ferrão, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Especificação das características físico-químicas para o controle de qualidade e identidade de diferentes méis de abelhas sem ferrão. A.T = Acidez Total; S.A = Sacarose Aparente; A.R = Açúcares Redutores; A.D = Atividade Diastásica; HMF = Hidroximetilfurfural (-) ausência do parâmetro no estudo.

Espécie	Umidade (%)	A.T (meq kg ⁻¹)	S.A (%)	A.R (%)	Cinzas (%)	A.D (°Gothe)	HMF (mg kg ⁻¹)	Fonte
<i>Melipona compressipes</i>	26,70	23,88	0,14	60,39	-	-	-	Almeida et al., 2007
<i>Melipona scutellaris</i>	23	26,93	3,51	51,23	0,03	-	38,08	Alves et al., 2011
<i>Melipona seminigra</i>	30,40	26,54	0,18	61,49	-	-	-	Alves et al., 2011
<i>Melipona fasciculata</i>	25,45	29,05	-	-	0,32	-	-	Alves et al., 2011
<i>Melipona subnitida</i>	27	20,55	0,78	61,17	0,03	-	8,64	Alves et al., 2011
<i>Melipona quadriasciata</i>	32,47	42,52	-	61,77	-	11,25	-	Ávila et al., 2018
<i>Melipona scutellaris</i>	29,1	19,9	1,8	70,7	0,19	< 3	2	Biluca et al., 2016
<i>Tetragonisca angustula</i>	24	79	-	43	-	-	-	Biluca et al., 2016
<i>Scaptotrigona xanthotricha</i>	29,84	28,78	1,22	66,32	0,21	0,62	58,27	Biluca et al., 2016
<i>Melipona arufivestres mondury</i>	27,70	38,2	-	65,60	-	< 3	-	Biluca et al., 2016
<i>Melipona bicolor</i>	34,68	91,62	-	60,14	-	< 3	-	Biluca et al., 2016
<i>Melipona mandacaia</i>	28,78	43,48	2,91	74,82	-	-	5,79	Biluca et al., 2016
<i>Melipona marginata</i>	32,44	22,55	0,85	67,39	0,14	0,19	48,09	Biluca et al., 2016
<i>Tetragonisca angustula</i>	24,3	39,2	4,2	53,6	0,21	16,7	1,3	Chuttong et al., 2016
<i>Tetragonisca angustula</i>	23,75	41,15	-	63,75	-	49,6	-	Fuenmayor et al., 2012
<i>Scaptotrigona bicunctata</i>	23,95	48,95	-	62,95	4,34	-	-	Jimenez et al., 2016
<i>Scaptotrigona depilis</i>	> 25	98,43	-	65,30	0,18	-	27,75	Lemos et al., 2017
<i>Melipona scutellaris</i>	33,98	27,25	0,7	66,41	0,16	0,11	40,86	Nascimento et al., 2015
<i>Tetragonisca angustula</i>	23,2	48,3	2,1	65,9	0,38	23	9,8	Nascimento et al., 2015
<i>Scaptotrigona</i> sp.	30,22	60,98	4,83	62,34	-	-	-	Nascimento et al., 2015
<i>Cephalotrigona capitata</i>	32,10	34,33	0,36	75,21	0,19	0,18	35,40	Nascimento et al., 2015
<i>Melipona bicolor</i>	36,18	48,58	0,57	68,43	0,18	0,12	31,58	Nascimento et al., 2015
<i>Melipona marginata</i>	32,65	79,82	-	63,50	-	< 3	-	Nascimento et al., 2015
<i>Melipona mondury</i>	29,75	61,10	-	67,45	-	< 3	-	Nascimento et al., 2015
<i>Melipona quadriasciata</i>	31,40	37,70	2,90	75,50	0,09	-	30,90	Nascimento et al., 2015
<i>Melipona seminigra</i>	28,85	30,44	1,61	69,12	0,22	0,20	29,50	Silva et al., 2013
<i>Melipona scutellaris</i>	23,4	28,7	-	62,7	-	< 3	-	Sousa et al., 2016
<i>Melipona subnitida</i>	23,17	41,58	-	57,67	0,07	-	13,60	Sousa et al., 2016
<i>Melipona asilvai</i>	37,50	54,20	3,30	61,70	0,09	-	14,70	Souza et al., 2009
<i>Melipona quadriasciata</i>	28,78	43,48	2,91	74,82	-	-	5,79	Souza et al., 2009

3.2.1.1 Açúcares

Os componentes majoritários do mel são os açúcares. Sendo que dos açúcares totais no mel, os monossacarídeos (glicose e frutose) se destacam sendo 80 % do total, e dissacarídeos (sacarose e maltose) representam apenas 10 % deste valor (SILVA *et al.*, 2013). A presença desses carboidratos pode influenciar na densidade, viscosidade, higroscopicidade, cristalização, valor energético e atividade antibacteriana do mel (KUROISHI *et al.*, 2012; ALMEIDA MURANDIAN *et al.*, 2013).

A frutose é o monossacarídeo presente em maior quantidade em mel de abelha sem ferrão, apresenta alta higroscopicidade (maior fluidez) e confere a doçura no mel; a glicose é o segundo açúcar em maior concentração, possui menor solubilidade em água e determina a tendência de cristalização do mel (ESCUREDO *et al.*, 2014; BILUCA *et al.*, 2014; BILUCA *et al.*, 2016). Apesar dos méis de meliponíneos possuírem alto nível de frutose, ainda assim, possuem valores inferiores de açúcares redutores quando comparados aos padrões de mel de quando comparados aos padrões estabelecidos para *Apis mellífera* (BILUCA *et al.*, 2014; CHUTTONG *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2016).

A presença de sacarose e maltose é frequentemente menor, quando comprados com a frutose e glicose, porém, também podem encontrados em méis de abelhas sem ferrão (SOUSA *et al.*, 2016). Os valores de sacarose podem variar. Elevadas concentrações podem ser devido a origem botânica, possível adulteração ou indicativo que o mel foi extraído de forma prematura e a sacarose não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase (CHUTTONG *et al.*, 2016).

3.2.1.2 Umidade

A água é o segundo componente em quantidade na composição do mel, sendo a umidade uma das características mais importantes do mel, podendo influenciar na viscosidade, maturidade, sabor, cristalização, conservação e estabilidade (NASCIMENTO *et al.*, 2015; BILUCA *et al.*, 2016; AL GHAMDI *et al.*, 2018).

O teor de umidade elevado nos méis de meliponíneos pode estar relacionado à origem do néctar das flores, frutos maduros e ricos em água, diferentes espécies de abelhas, região, época da coleta e manejo do meliponicultor (VILLAS BÔAS; MALASPINA, 2005; CHUTTONG *et al.*, 2016; BILUCA *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2016).

O teor de umidade pode interferir em várias características dos méis como viscosidade, peso, maturidade, sabor e na sua cristalização, além disso, valores de atividade

de água ($> 0,6$) permitem o desenvolvimento de microrganismos (NASCIMENTO *et al.*, 2015; ZUCCATO *et al.*, 2017).

3.2.1.3 Acidez

A acidez é um parâmetro importante para a estabilidade e preservação do mel, dificultando a ação e desenvolvimento de microrganismos, indicando as condições de armazenamento e a ocorrência de processos fermentativos, influenciando na vida útil do produto (CRANE, 2007).

A acidez do mel está relacionada aos ácidos orgânicos presente na sua composição, estes ácidos podem ser provenientes das diversas fontes de néctar coletado, da ação da enzima glicoseoxidase que origina o ácido glucônico, além da ação de microrganismos que fermentam os açúcares do mel durante sua maturação (FINOLA *et al.*, 2007).

O ácido presente em maior quantidade é o glucônico, gerado pela ação da enzima glicoseoxidase (produzida pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas) sobre a glicose; porém existem outros ácidos que podem ser encontrados em menor quantidade como o ácido fórmico, butírico, acético, cítrico, málico, láctico, oxálico, pirúvico, fumárico e tartárico (OLAITAN *et al.*, 2007; SANCHO *et al.*, 2013; ALMEIDA MURADIAN *et al.*, 2013).

3.2.1.4 Atividade Diastásica

A diástase (α -amilase) é uma enzima presente no mel que é formada a partir das glândulas hipofaringeanas das abelhas, podendo também ser encontrada em pequenas proporções nos grãos de pólen, sua função é hidrolisar a molécula de amido. Sua relevância para o mel é que essa enzima apresenta maior sensibilidade quando submetida a temperaturas acima de 40 °C por um período prolongado, sendo um parâmetro importante para avaliar se o produto sofreu processos de aquecimento acima de 60 °C, adulterações pela adição de açúcar invertido, ou por condições inadequadas de armazenamento (MELO *et al.*, 2003; AROUCHA *et al.*, 2008; AROUCHA, 2012; HOLANDA *et al.*, 2015).

A atividade diastásica para mel de meliponíneos é relativamente baixa ou ausente, apresentando valores de no máximo 3 e no mínimo 0,3 na escala Gothe, inferior ao estabelecido pela legislação para *Apis*, mesmo em amostras de mel recém coletadas e sem sofrerem aquecimento, sendo uma característica inerente a esse tipo de abelha (HOLANDA *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013; BILUCA *et al.*, 2016).

3.2.1.5 Hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF é um dos parâmetros utilizados para indicar o frescor e a qualidade do mel. Sua presença pode indicar que o mel foi submetido ao aquecimento e/ou foi armazenado por longos períodos, além de indicar adulterações provocadas por adição de açúcar invertido. O HMF é um composto formado pela degradação de açúcares através da reação de Maillard (reação de escurecimento enzimático) ou desidratação de hexose em meio ácido (SOUSA *et al.*, 2016). Além do aquecimento e condições de estocagem, outros fatores como o potencial hidrogeniônico (pH), acidez, atividade de água, assim como, presença de açúcares simples (glicose e frutose), ácidos e minerais (PASIAS *et al.*, 2017).

A legislação vigente (Brasil, 2000) permite a comercialização do mel de *Apis mellifera* com no máximo 60 mg/kg de HMF, porém não existem padrões estipulados para méis de meliponíneos.

3.2.2 Qualidade microbiológica de mel de abelha sem ferrão

A microbiota associada aos meliponíneos é bem diversificada, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (PAULA *et al.*, 2021). Além de contribuir para a identificação da qualidade microbiológica dos produtos e definir parâmetros para estabelecer a vida útil e sua segurança, alguns destes microrganismos também podem atuar melhorando as características organolépticas e o valor nutricional dos produtos (ALMEIDA ANACLETO, 2007; SNOWDON e CLIVER, 1996).

As condições químicas do mel tornam o ambiente inóspito para o desenvolvimento e permanência da maioria dos microrganismos, especialmente para os patógenos, mantendo a microbiota em estado de latência (SILVA *et al.*, 2017; ESTEVINHO *et al.*, 2012). No entanto, muitos microrganismos podem sobreviver ou proliferar sob condições mais severas como em altas concentrações de açúcares, alta osmolaridade, baixo teor de água, baixo pH, e na presença de compostos antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2017; DUARTE, 2014; ESTEVINHO *et al.*, 2012).

Os microrganismos capazes de se desenvolver em ambientes de alta concentração de açúcar são denominados osmofílicos, enquanto que os que sobrevivem em ambientes com baixa atividade de água recebem denominação de xerófilos (DUARTE, 2014). Alguns microrganismos como as bactérias lácticas e as leveduras podem se desenvolver em pH menor que 4,5 (ESTEVINHO *et al.*, 2012).

A Instrução Normativa Nº 11/2000 (BRASIL, 2000) que estabelece padrões de qualidade para mel de *Apis mellifera* não exige a realização de análises microbiológicas;

refere-se apenas que devem seguir os padrões higiênico-sanitários e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializadores de alimentos.

Apesar da legislação brasileira não exigir ou estabelecer um padrão para análises microbiológicas para o mel; a investigação de microrganismos como coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C, bolores e leveduras, podem auxiliar na identificação da qualidade microbiológica e na segurança do produto (ALMEIDA ANACLETO, 2007).

A portaria ADAB nº 207 de 21/11/2014, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelha social sem ferrão do gênero *Melipona*, estabelece que a tolerância para coliformes a 45 °C é de 10^2 Número Mais Provável (NMP)/g⁻¹ ou mL⁻¹, e para bolores e leveduras é de 10^4 Unidade Formadora de Colônia (UFC)/g⁻¹ ou mL⁻¹ e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g.

Os microrganismos associados ao mel de abelhas sem ferrão podem ser inerentes de fontes primárias e secundárias. As fontes microbianas primárias são introduzidas pelas abelhas através do pólen, do seu trato digestivo, do solo, do ar, do néctar; e as fontes secundárias incluem contaminações provenientes da manipulação, processamento e armazenamento realizados de forma inadequada (OLAITAN *et al.*, 2007; ROZANSKA e OSEK, 2012).

Ávila *et al.* (2018) avaliaram 32 amostras de méis de abelhas sem ferrão. Os resultados obtidos para mesófilos aeróbicos variaram entre 2 e 4,77 UFC/g⁻¹ para *Scaptotrigona bipunctata* e *Melipona marginata*, respectivamente. Em relação aos coliformes a 35 °C, 78 % das amostras apresentaram < 3 NMP/g⁻¹ e apenas 6 % das amostras de *Scaptotrigona* apresentaram coliformes a 45 °C. Para bolores e leveduras foi detectada contagem com um valor médio de 3,4 UFC/g⁻¹.

Rodrigues *et al.* (2018) observaram a presença significativa de bolores e leveduras ($9,4 \times 10^4$ a $1,3 \times 10^5$ UFC/g⁻¹), microrganismos do grupo coliformes a 35 °C ($> 2,3 \times 10^1$ NMP/g⁻¹) e coliformes a 45 °C (4 e < 3 NMP/g⁻¹) em amostras de méis das espécies *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona depilis* e *Melipona quadrifasciata* dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

David *et al.* (2017) identificaram a presença de bolores e leveduras, sendo encontrados valores toleráveis < 3 UFC/g⁻¹ para amostras de mel de das espécies *Tetragonisca angustula* do Estado de Rondônia. Estes autores também observaram que duas amostras apresentaram contaminação por coliformes a 35 °C (3×10^2 e $2,1 \times 10^3$ NMP/g⁻¹) e uma por coliformes a 45 °C (3×10^2 NMP/g⁻¹).

De acordo com os estudos realizados por outros pesquisadores pode-se verificar a presença de coliformes, bolores e leveduras em diferentes amostras de méis de abelhas sem ferrão. Estas contaminações podem ser provenientes da microbiota do pólen, do néctar, da abelha e/ou inadequadas condições higiênicas sanitárias durante a manipulação e processamento do produto (FERNANDES *et al.*, 2018).

Diversas espécies bacterianas e de leveduras associadas às abelhas sem ferrão também podem desempenham papel essencial para a nutrição e desenvolvimento dos insetos (MADDEN *et al.*, 2018).

Esses microrganismos são capazes de produzir enzimas que podem estar envolvidas na quebra de macronutrientes presentes no néctar e pólen, além de fermentar açúcares e produzir ácidos orgânicos, contribuindo para a transformação dos produtos e para a melhoria do seu valor nutricional (NGALIMAT *et al.*, 2019; PAULA *et al.*, 2021). Além diiso, podem produzir compostos antimicrobianos capazes de proteger a colônia contra microrganismos patogênicos (RODRIGUEZ HERNANDEZ *et al.*, 2019; MENEGATTI *et al.*, 2020).

As bactérias mais associadas às abelhas sem ferrão são *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Fructobacillus*, *Lysinibacillus* e *Neisseria* (DÍAZ *et al.*, 2017; NGALIMAT *et al.*, 2019; RODRIGUEZ HERNANDEZ *et al.*, 2019; SUPHAPHIMOL *et al.*, 2020).

Dentre as bactérias, destacam-se as bactérias ácido lácticas. A presença dessas bactérias pode inibir a microbiota concorrente como as bactérias deteriorantes e patogênicas; além de produzir ácidos orgânicos como o ácido láctico, resultando em um pH mais baixo e na obtenção de compostos antimicrobianos (CINTAS *et al.*, 2001). Os resultados obtidos por Ávila *et al.* (2018) para bactérias ácido lácticas em amostras de mel variaram de 1,24 UFC/g⁻¹ para *Scaptotrigona bipunctata* a 5,82 UFC/g⁻¹ para *Melipona quadrifasciata*.

Os gêneros de leveduras mais observados em mel de abelhas sem ferrão são *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Dekkera*, *Kloeckera* e *Pichia* (ROSA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003; SEIJO *et al.*, 2011; SAKSINCHAI *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2016). Sendo *Starmerella meliponinorum*, *Metschnikowia* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces rosei*, *Lachancea fermentati*, *Pichia anomala*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Dekkera bruxellensis* e *Kloeckera africana*, as espécies mais identificadas (ROSA *et al.*, 2003; SEIJO *et al.*, 2011; SINACORI *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2005; MEIRELES, 2018).

Fungos filamentosos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* foram identificados no mel, no pólen, e no interior dos ninhos de *Melipona scutellaris*. (BARBOSA *et al.*, 2018). Outras espécies pertencentes ao gênero *Monascus* spp. também foram encontradas em substratos de *Melipona scutellaris*. Os micélios fúngicos que crescem sobre os alimentos armazenados no ninho são essenciais para o desenvolvimento larval da abelha e os esporos dos fungos podem ser utilizados pelas abelhas como recurso alimentar (BARBOSA *et al.*, 2017; BARBOSA *et al.*, 2018).

Embora existam diversas espécies de microrganismos associadas às abelhas, aos ninhos e aos produtos de abelhas sem ferrão, o benefício relacionado à suas interações com os insetos e a riqueza de espécies existentes, ainda são pouco estudadas (PAULA *et al.*, 2021).

3.3 Pólen de abelha sem ferrão

O pólen é a principal fonte de proteína, lipídios e vitaminas para as abelhas (BRODSCHNEIDER e CRAILSHEIM, 2010). O pólen das abelhas sem ferrão é um subproduto elaborado a partir do pólen coletado das flores que adicionado de néctar e enzimas salivares (amilase e glicosidase) da abelha, passa por um processo de fermentação em potes dentro das colônias. O pólen das abelhas sem ferrão também pode ser referido como pólen fermentado, pólen de pote, pólen armazenado ou samburá (KIELISZEK *et al.*, 2018; VIT *et al.*, 2018).

O pólen fermentado apresenta composição química variada, de modo geral, consiste em carboidratos, proteínas e lipídios; também contém outros micronutrientes, como minerais (cálcio, cloro, cobre, ferro, magnésio, iodo, molibdênio, selênio), vitaminas (A, B, C, D E), compostos fenólicos e aminoácidos essenciais, além de possuir propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (THAKUR e NANDA, 2020; KOMOSINSKA VASSEV *et al.*, 2015). Devido esta riqueza de nutrientes, o pólen fermentado foi denominado de “alimento perfeitamente completo” (MCFREDERICK *et al.*, 2012; KOSTIC *et al.*, 2015; SZCZESNA, 2006).

3.3.1 Características físico-químicas do pólen de abelha sem ferrão

O pólen fermentado apresenta características físico-químicas distintas do pólen apícola como pode ser observado através dos valores estabelecidos pela Instrução Normativa Nº 03, de 19 de janeiro de 2001 que aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Pólen Apícola, comparados aos resultados obtidos por Alves *et al.* (2018),

Rebello *et al.* (2016) e Ferreira Caliman (2012) para análises físico-químicas do pólen coletado por abelhas sem ferrão (Tabela 4).

Tabela 4 - Características físico-químicas do pólen apícola estabelecidas pela legislação brasileira, e resultados obtidos por estudos conduzidos com pólen de abelhas sem ferrão. Fonte da legislação brasileira: Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001 - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola. Resultados obtidos por Alves *et al.* (2018), Rebello *et al.* (2016) e Ferreira-Caliman (2012) para pólen coletados por diferentes espécies de abelhas sem ferrão.

Características Físico-químicas (%)	Pólen Apícola	Pólen coletado			
		<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Melipona scutellaris</i>	<i>Melipona seminigra</i>	<i>Melipona interrupta</i>
Umidade	30	44,71	51,7	53,93	37,12
Proteína	8	23,88	19,7	37,63	24
Lipídeos	1,8	4,25	2,5	10,81	6,47
Cinzas	4	1,84	2,4	4,03	2,74
Fibra bruta	2	0,87	2,76	9,3	13,65
Carboidratos	14,5 a 55	24,48	-	25,66	44,27
pH	4 a 6	3,75	3,8	3,7	3,34

Os resultados obtidos (Tabela 4) mostram que as amostras de pólen das abelhas sem ferrão possuem alto teor de umidade (37,12 a 53,93 %), proteínas (19,7 a 37,63%), lipídeos (2,5 a 10,81 %) e para algumas espécies a quantidade de fibras é considerável (9,3 a 13,65 %) quando comparadas ao pólen apícola.

A Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001 estabelece os parâmetros físico-químicos para pólen de *Apis melífera* isto se deve ao fato deste produto ser consumido no Brasil e em outros países como Bulgária, Polônia e Suíça (CAMPOS *et al.*, 2010).

Para pólen de meliponíneos, os parâmetros físico-químicos ainda não foram estabelecidos devido à comparação dos valores obtidos do pólen fermentado com o padrão de pólen de *Apis melífera*. (MOHAMMAD *et al.*, 2020). Os produtos de abelhas sem ferrão possuem características físico-químicas muito peculiares, tornando complexo generalizar aos parâmetros para abelhas *Apis* (ARES *et al.*, 2018).

É importante realizar estudos para a obtenção de informações sobre as características físico-químicas dos produtos oriundos de abelhas sem ferrão, visando estabelecer padrões de qualidade e identidade, visto a ausência de uma legislação específica para estes produtos e a grande diversidade de espécies que torna a composição destes produtos muito variável (VILLAS BÔAS e MALASPINA, 2005; CARVALHO *et al.*, 2013).

3.3.2 Qualidade microbiológica de pólen de abelha sem ferrão

A microbiota do pólen favorece a nutrição e o desenvolvimento das abelhas, auxilia no processo digestivo das abelhas e na transformação bioquímica do produto; além de proteger a colônia contra microrganismos oportunistas como os patogênicos (VÁSQUEZ e OLOFSSON 2009; ROULSTON e CANA, 2000; ENGEL *et al.*, 2012).

Embora os registros da microbiota do pólen de abelhas *Meliponini* sejam limitados, pode-se verificar a presença de bactérias benéficas como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* (MOHAMMAD *et al.*, 2021); leveduras como *Starmerella* e *Zigosaccharomyces osmophilus* (SANTOS *et al.*, 2018; COSTA NETO *et al.*, 2020; MATOS *et al.*, 2020) e espécies fungos como *Penicillium* e *Talaromyces* (BARBOSA *et al.*, 2018).

As bactérias ácido lácticas do pólen fermentado são capazes de produzir compostos antimicrobianos e enzimas que são industrialmente importantes por conferir benefício à saúde, tornando o pólen fermentado um alimento probiótico (NGALIMAT *et al.*, 2019; MOHAMMAD *et al.*, 2020).

As Bactérias lácticas com potencial probiótico que foram identificadas no pólen fermentado sugere a aplicação destes microrganismos na indústria de alimentos (MOHAMMAD *et al.*, 2020). Os *Lactobacillus* correspondem a 83,9 % das espécies encontradas no pólen fermentado (ASAMA *et al.*, 2015).

Bactérias como *Bacillus* também participam da fermentação do pólen, embora participem com menor intensidade quando comparadas com as bactérias ácido lácticas (GILLIAM *et al.*, 2000). Foram encontrados *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* no pólen de abelhas sem ferrão, estes exibiram capacidade de fermentação açúcares como a glicose, frutose e sacarose como substrato (RAMOS *et al.*, 2020; AQEEL e UMAR, 2010; AKCAN, 2011).

Os gêneros de leveduras encontrados no pólen foram *Candida*, *Hyphopichia*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces*. E as espécies *Starmerella neotropicalis*, *Starmerella meliponinorum*, *Starmerella apicola*, *Kodamaea ohmeri* e *Wickerhamiella versalitis* (ROSA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003; DANIEL *et al.*, 2013; MEIRELES, 2018). As leveduras exercem um papel importante no processamento e transformação do pólen dentro das colônias, secretando enzimas que participam dos processos bioquímicos que contribuem na transformação do pólen apícola em pólen fermentado, tornando os nutrientes biodisponíveis e melhorando qualidade nutricional do alimento (MEIRELES, 2018).

3.4 Leveduras e interação com as abelhas sem ferrão

As leveduras são fungos eucarióticos unicelulares, não filamentosos, que se reproduzem predominantemente de forma assexuada por brotamento ou fissão binária, podendo se reproduzir sexuadamente. As espécies de leveduras estão distribuídas em dois filos do reino Fungi, o Basidiomycota e o Ascomycota (KURTZMAN *et al.*, 2011).

São microrganismos anaeróbicos facultativos, ou seja, podem utilizar ou não o oxigênio para produzir energia (TORTORA *et al.*, 2012). Elas toleram uma ampla faixa de pH, variando de 2 e acima de 9; crescem em temperatura de 10 °C a 35 °C, embora algumas espécies possam crescer abaixo ou acima desta faixa. A atividade de água (aw) para crescimento de fungos de origem alimentar é relativamente baixa, a maioria das espécies podem crescer em aw de 0,85 ou menos, porém as leveduras requerem maiores valores para crescimento (RAMOS e MAGALHÃES GUEDES, 2021a).

As leveduras apresentam uma grande diversidade de espécies com propriedades fisiológicas distintas (KURTZMAN *et al.*, 2011). Elas podem ser encontradas em diversos ambientes, por exemplo, nas superfícies das plantas, folhas, frutos, néctares das flores, no solo, no ar, nas relações simbióticas com animais, em ambientes com altas concentrações de açúcar ou sal, em locais com baixa disponibilidade de oxigênio e de baixas temperaturas (KURTZMAN *et al.*, 2011; MONTES DE OCA *et al.*, 2016).

Esses microrganismos exercem papel importante na indústria por serem potenciais fermentadores de açúcares e produtores de enzimas que são úteis para vários processos biotecnológicos. A utilização de algumas espécies de leveduras nos bioprocessos é possível por não apresentar características patogênicas, ser de fácil manipulação e prospecção, possui rápido crescimento em vários substratos, curto tempo para fermentação, capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular (BARRIGA *et al.*, 2011).

Por outro lado, algumas leveduras também podem causar deterioração em alimentos e bebidas, ocasionando grande perda econômica (FLEET, 2008). Alguns gêneros como *Saccharomyces* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Zygosaccharomyces* spp., *Brettanomyces* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Dekkera* spp., *Pichia* spp., *Yarrowia* spp. estão frequentemente associados à deterioração de alimentos e bebidas. A deterioração pode ser controlada através da implantação de boas práticas de fabricação, pela aplicação dos princípios de análise de pontos críticos de controle de análise de perigos (APPCC) e por outros programas de gestão da qualidade (RAMOS e MAGALHÃES GUEDES, 2021b).

As leveduras têm sido isoladas de diferentes biomas, sendo observadas em insetos de diferentes ordens e em variados substratos visitadas por eles. A interação entre inseto e

microrganismo é benéfica para o microrganismo, pois permite a sua disseminação para ambientes com riqueza de substrato; e para os insetos que recebem nutrientes essenciais produzidos por esta interação, são protegidos de patógenos pela presença de substâncias antimicrobianas produzidas pelas leveduras, e são favorecidos na digestão de alimentos pela liberação de enzimas provenientes destes microrganismos (LACHANCE *et al.*, 2001; YAMADA *et al.*, 2003; VEGA e DOWD, 2005).

A associação entre leveduras e as abelhas sem ferrão foi reportada pela primeira vez no trabalho de Rosa *et al.* (2003). As leveduras associadas aos meliponíneos podem ser encontradas nas plantas e flores, no pólen e no néctar coletados pelas mesmas, no mel, no pólen fermentado (samburá), nas células de cria, nas larvas, e no trato digestivo das abelhas (ROSA *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2009; THIAGO CALAÇA, 2011; COSTA NETO *et al.*, 2016).

Embora o mel apresente propriedades físico-químicas que impedem o desenvolvimento e a proliferação de microrganismos, como baixa atividade de água, baixo pH, alta concentração de açúcares, alta osmolaridade, além da presença de compostos antimicrobianos; acredita-se que a inoculação das leveduras no mel seja provenientes das próprias abelhas (ESTEVINHO *et al.*, 2012; ROZANSKA e OSEK, 2012).

Poucos estudos abordam a diversidade das leveduras associadas às abelhas sem ferrão e aos seus produtos (SILVA *et al.*, 2017). No Brasil, as espécies já descritas são *Starmerella meliponinorum*, *Starmerella neotropicalis*, *Starmerella etchellsii*, *Starmerella apícola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces rosei*, *Zygosaccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces machadoi*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kodamaea ohmeri*, *Debaryomyces* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Lachancea fermentati*, *Pichia* sp., *Pichia anomala*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia kluyveri*, *Candida* sp., *Candida orthopsilosis*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Wickerhamiella versalitis*, *Metschnikowia* sp., *Dekkera bruxellensis*, e *Kloeckera africana* (ROSA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003; ROSA e LACHANCE 2005; DANIEL *et al.*, 2013; SEIJO *et al.*, 2011; SINACORI *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2005; MEIRELES, 2018).

As espécies de leveduras mais associadas aos meliponíneos e ou aos substratos visitados por estes insetos pertencem ao gênero *Starmerella* spp. Este grupo engloba aproximadamente 50 espécies (SANTOS *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2020; COSTA NETO *et al.*, 2020). Elas são leveduras ascomicéticas, se restringem a utilização de poucas fontes de carbono; muitas destas espécies possuem preferência por frutose como fonte de

carbono e energia (frutofilia) e a produção de soforolipídeos (ROSA *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2020).

Os soforolipídios são compostos de origem microbiana que exibem propriedades biossurfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante; propriedades de interesse para diversas aplicações industriais, cosméticas e farmacêuticas (WEBER *et al.*, 1992).

As espécies *Starmerella meliponinorum*, *Starmerella neotropicalis*, *Starmerella etchellsii*, *Starmerella apicola* estão associadas aos substratos das abelhas como o pólen, néctar, mel maduro, pellets de lixo e nas abelhas adultas; algumas espécies de leveduras, em associação com bactérias, são capazes de fermentar o néctar coletado pelas abelhas (DANIEL *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2018; COSTA NETO *et al.*, 2020; PAULA *et al.*, 2021).

A *Starmerella meliponinorum* foi descrita pela primeira vez por Teixeira *et al.* (2003) como uma das espécies mais prevalente associada a diferentes abelhas sem ferrão. A espécie foi encontrada em descartes feitos pelas abelhas na colmeia, no pólen apícola, no mel e na própolis de *Tetragonisca angustula*, em mel de *Melipona quadrifasciata* e em abelhas adultas *Melipona rufiventris* e *Trigona fulviventris*.

Estudo realizado por Rosa *et al.* (2003) também identificou alta prevalência de *Starmerella meliponinorum* em mel de *Tetragonisca angustula* em mel de *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata* e *Frieseomelitta* do estado de Minas Gerais. Já o trabalho de Daniel *et al.* (2013) mostra a incidência de *Starmerella neotropicalis* no pólen de abelha *Melipona quinquefasciata*.

A segunda espécie mais prevalente é a *Starmerella apícola*, sendo identificada em todas as amostras de mel de *Nannotrigona testaceicornis*, *Melipona fasciculata*, *Melipona scutellaris*, *Plebeia emerina*, *Plebeia saiqui* (MASSARO *et al.*, 2018).

Gêneros como *Starmerella*, *Candida* e *Metschnikowia* são responsáveis por produzir e liberar enzimas que melhoram, protegem e preservam o pólen, além de produzir substâncias antimicrobianas que podem proteger a colônia de patógenos (GILLIAM, 1997; ROSA *et al.*, 2003).

Além do gênero *Metschnikowias*, também foram observados *Debaryomyces* e *Zygosaccharomyces* em potes de mel de abelhas sem ferrão, no trato digestivo das abelhas, na superfície do corpo das operárias, e no néctar das flores visitadas pelas abelhas (BRYSCH HERZBERG, 2004; ROSA *et al.*, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2003; SEIJO *et al.*, 2011; SAKSINCHAI *et al.*, 2012).

As espécies de *Candida* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia anomala*, e *Kloeckera africana* foram identificadas em amostras de mel das abelhas sem ferrão *Melipona mandacaia*, *Melipona asilvai*, *Partamona* sp. e *Scaptotrigona* sp. que vivem na floresta tropical seca brasileira (BARBOSA *et al.*, 2016).

O gênero *Debaryomyces* engloba quinze espécies que podem ser encontradas em diferentes habitats naturais como o ar, solo, pólen, plantas, frutas e insetos (KURTZMAN e FELL, 1998; SUZUKI *et al.*, 2011). As *Debaryomyces hansenii* assim como a *Zygosaccharomyces* sp. também foram encontradas em associação às abelhas adultas de *Melipona quadrifasciata* (ROSA *et al.*, 2003). Já a *Candida* sp., *Candida orthopsilosis*, *Wickerhamiella versalitis*, *Debaryomyces* sp., *Metschnikowia* sp., *Pichia* sp., *Pichia kluyveri*, *Kodamaea ohmeri*, foram associadas ao ninho das abelhas *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (MEIRELES, 2018).

A *Debaryomyces hansenii* é uma levedura não patogênica, frequentemente encontrada em produtos ricos em proteínas (ENCINAS *et al.*, 2000; PETERSEN *et al.*, 2002; MASOUD e JAKOBSEN, 2005; ANDRADE *et al.*, 2010). Possui tolerância ao sal, é capaz de se desenvolver em baixas temperaturas, baixo valor de pH, metaboliza ácidos orgânicos e aminoácidos, regulam a acidez de produtos fermentados, possuem atividades lipolíticas e proteolíticas que contribuem para o desenvolvimento do sabor de muitos produtos (DURÁ *et al.*, 2002; OLENSSEN e STAHNKE, 2000; SORENSEN e SAMUELSEN, 1996).

A *Debaryomyces hansenii* é de interesse biotecnológico devido ao seu potencial fermentativo, além da produção de proteases, α -galactosidades, de etanol e de xilitol a partir de xilose (BOLUMAR *et al.*, 2008; VIANA *et al.*, 2007; MENON *et al.*, 2010; PRAKASH *et al.*, 2010).

A *Dekkera bruxellensis* é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono como a glicose, frutose, sacarose, maltose, galactose; utiliza amônia, prolina, arginina e nitrato como fontes de nitrogênio; além disso, é tolerante a etanol, possui poder fermentativo em altas concentrações de glicose e é anaeróbica facultativa. Esta levedura produz metabólitos como ácido acético e etilfenóis (4-etilfenol e 4-etilguaiaicol), substâncias que podem conferir aromas desagradáveis para algumas bebidas alcoólicas (CHATONNET *et al.*, 1997; MALFEITO FERREIRA, 2018).

Em 1964, o gênero *Dekkera* foi introduzido na taxonomia como teleomórfico (sexual) de *Brettanomyces* (VAN DER WALT, 1964). Atualmente, ambos os nomes são utilizados na literatura como sinônimos (KURTZMAN *et al.*, 2011).

As espécies de *Pichia* podem ser encontradas no meio ambiente, principalmente no solo, plantas e nos frutos (KURTZMAN *et al.*, 2011). Estudos comprovaram que a *Pichia kluyveri* possui potencial aromático e pectinolítico na fermentação mista de cacau, além de melhorar o sabor do chocolate (CRAFACK *et al.*, 2013).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são comumente utilizadas em processos fermentativos, sendo industrialmente a *Saccharomyces cerevisiae* a espécie mais utilizada. Isto se deve a capacidade dessa espécie apresentar alto nível de tolerância ao etanol, além de fermentar grande diversidade de açúcares e se adaptar a uma faixa variável de pH (RADECKA *et al.*, 2015; MIRANDA, 2012; MUKHERJEE *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2012).

As leveduras do gênero *Zigosaccharomyces* estão associadas a diferentes aspectos das colônias de abelhas sem ferrão (CHIKANO e TAKAHASKI, 2020; RODRIGUEZ HERNANDEZ *et al.*, 2019). Devido à sua alta abundância de substrato, principalmente de açúcares, o mel é o habitat natural para essas espécies (MATOS *et al.*, 2020).

Estudos mostram a interação das abelhas sem ferrão *Scaptotrigona depilis* com as leveduras do gênero *Zygosaccharomyces*. Verificando que leveduras do gênero *Zygosaccharomyces* produzem moléculas percussoras para a síntese de esteroides importantes para desenvolvimento do estágio larval de abelhas da espécie *Scaptotrigona depilis* (PALUDO *et al.*, 2018).

Algumas espécies de *Zigosaccharomyces* estão associadas a fermentação do mel; no entanto, outras cepas estão envolvidas na deterioração dos produtos da armazenados na colônia (CHIKANO e TAKAHASKI, 2020). Espécies como a *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces rouxii* são reconhecidas como agentes de deterioração relevantes (JAMES e STRATFORD, 2011).

Devido à diversidade de leveduras e a quantidade de espécies de abelhas sem ferrão, ainda é necessário estudos sobre a associação destes microrganismos com os produtos destas abelhas. Estes microrganismos exercem papel importante para a nutrição das abelhas, na produção de biomoléculas atuam na transformação do néctar e do pólen, na produção de substâncias antimicrobianas têm a finalidade de inibir o crescimento de patógenos (PAULA *et al.*, 2021, MENEZES *et al.*, 2013; DOUGLAS, 2015; STEFANINI, 2018). Além disso, esta interação pode influenciar na biodiversidade de leveduras visto que estes insetos atuam na dispersão dos microrganismos no meio ambiente (STEFANINI, 2018).

3.5 Identificação de leveduras: MALDI-TOF

A identificação microbiana pode ser realizada através de métodos tradicionais, técnicas de biologia molecular ou por espectrometria de massa. As técnicas tradicionais são baseadas no cultivo e na observação das características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Embora forneçam informações importantes da identificação das leveduras, os métodos microbiológicos tradicionais requerem muitos testes bioquímicos, resultando em um processo complexo, laborioso, e nem sempre é conclusivo em nível de gênero e espécies de leveduras, visto a alta variabilidade morfológica e bioquímica de algumas espécies (PERATONI e QUEIROZFERNANDES, 2019; POPOVIC *et al.*, 2017; KURTZMAN *et al.*, 2011; VIANA *et al.*, 2011).

A grande quantidade de etapas que envolvem a metodologia tradicional de identificação e muitas vezes a falta de precisão para classificar as espécies de leveduras induziu a busca por métodos moleculares para a determinação taxonômica destes microrganismos (PORTER e GOLDING, 2012).

As técnicas de biologia molecular (à base de ácido nucleico) como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), hibridização DNA-DNA, Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP), Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) dos cromossomos e Análise de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) podem ser utilizadas para diferenciar cepas de leveduras (FERNANDEZ ESPINAR *et al.*, 2011); NACEF *et al.*, 2016; SANDRIN *et al.*, 2013).

A região do RNA ribossômico (rRNA) / DNA ribossômico (rDNA) é frequentemente mais estudada para identificação de organismos, pelo fato dos ribossomos estarem presentes em todas as células, e possuírem origem evolutiva comum (RENOUF; CLAISSE; LONVAUD FUNEL, 2007). Para a identificação de leveduras, os genes mais utilizados são os que codificam o 18S rDNA e 26S rDNA, destacando-se a sequência do gene da subunidade 26S do rRNA, nos domínios D1 e D2 que compreende cerca de 600 nucleotídeos para diferenciar as cepas (FRANCESCA *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2011).

Uma técnica que tem sido empregada para identificar espécies de leveduras é a espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz e analisador de tempo de voo (MALDI-TOF) (RAMOS e MAGALHÃES GUEDES, 2021b). MALDI-TOF é um método óptico, de fácil manipulação, confiável, e também pode ser utilizado para identificação das leveduras. A técnica é baseada na detecção e comparação da impressão digital das proteínas ribossomais obtidas das células microbianas em um espaço curto de tempo (USBECK *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2020). Além disso, “o método tem a capacidade

de identificar diversos tipos de microrganismos e, portanto, possui capacidade para substituir outros métodos de identificação em laboratórios de Microbiologia” (BISWAS e ROLAIN, 2013).

Originária do inglês: MALDI, é a sigla de *Mass Assisted Laser Desorption/Ionization*, ou seja, dessorção/ionização por laser assistido por matriz. Os equipamentos de MS apresentam variados analisadores que separam os íons de diferentes pesos/massas. Entre tais analisadores/separadores de íons, há aqueles que diferenciam os pesos/massas pelo tempo de voo destas moléculas em tubo de vácuo (TOF: *time of flight*) (CARBONELLE e NASSIF, 2011; LIMA NETO *et al.*, 2014).

A espectrometria de massas passou a ser utilizada na década de 1970, como forma de identificação de microrganismos. Consiste em uma tecnologia analítica que possibilita o reconhecimento da composição química de um composto isolado, ou de diferentes misturas complexas, por meio da determinação de suas massas moleculares, na forma iônica (PEREIRA *et al.*, 2014).

Entretanto, foi a partir de 1988 que o método ganhou maior notoriedade no meio científico, sendo possível ionizar moléculas maiores com o uso de laser e de uma matriz combinada por pequenas partes de cobalto e glicerol (MAIER *et al.*, 2006; CROXATTO, PROD’HOM, GREUB, 2012).

A técnica MALDI-TOF funciona inoculando-se as células do microrganismo diretamente das placas ou proteínas extraídas na placa de bioalvo MALDI, adiciona-se uma solução matriz, após essa mistura (solução matriz e células/proteínas do microrganismo) é seca à temperatura ambiente. A placa é levada para o equipamento, sofre uma irradiação através de uma luz ultravioleta (laser de nitrogênio de onda 33nm) que vaporiza a amostra, e a converte em energia térmica; há a ionização das moléculas, elas são aspiradas dentro de um tubo de vácuo de acordo com seu peso molecular, e levadas a um detector que estabelece um espectrograma de massa conforme o tempo de chegada das moléculas. (MAYORAL *et al.*, 2018; TSUCHIDA, UMEMURA, NAKAYAMA, 2020).

A identificação das espécies por MALDI-TOF é realizada através da comparação dos espectros obtidos com os espectros de referência contidos em uma base de dados computadorizada. Alguns picos (massas moleculares) são específicos para o gênero, espécie, subespécies, os espectros obtidos podem ser reproduzíveis desde que os microrganismos sejam cultivados nas mesmas condições (CARBONELLE *et al.*, 2011)

Existem vários bancos de dados disponíveis para comparar os espectros obtidos e identificar as espécies de microrganismos, como a biblioteca MALDI Biotyper (MBL). “O

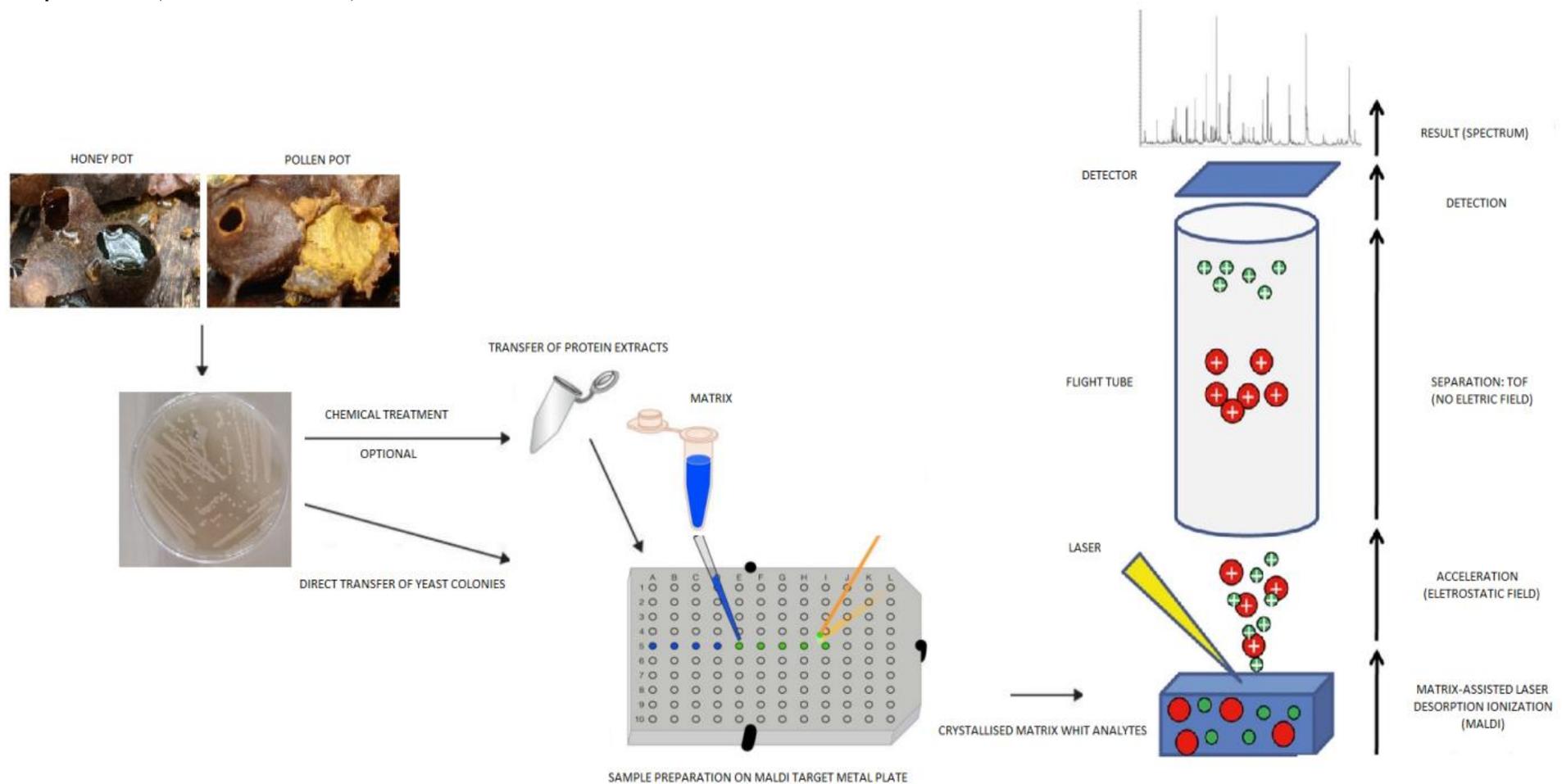
MBL contém um banco de dados de impressões digitais específicas de uma grande variedade de bactérias e leveduras. A identificação é feita combinando os espectros desconhecidos obtidos com os espectros conhecidos em um banco de dados usando o software Biotyper” (CLARK *et al.*, 2013).

A precisão do resultado dependerá do banco de dados utilizado, dessa forma é necessário que este banco seja atualizado para aprimorar a identificação do instrumento MALDI (DE CAROLIS *et al.*, 2014). Porém, Martiny *et al.* (2012) ressalta que a precisão de identificação até o nível de espécie fornecida pelo método é superior a 90%.

A tecnologia MALDI-TOF traz maior agilidade na identificação de microrganismos, sendo possível obter resultados entre o preparo da amostra e a leitura final em menos de 1 hora, quando comparado com os outros métodos tradicionais realizados em laboratórios (CROXATTO; PROD’HOM; GREUB, 2012).

Na literatura os achados comprovam que o método do MALDI-TOF apresenta resultados satisfatórios, além de comprovar o potencial desta tecnologia para discriminar espécies de microrganismos de forma rápida e precisa, quando realizado em condições bem definidas (USBECK *et al.*, 2014; CHANG *et al.*, 2016). A Figura 3 mostra o princípio do funcionamento da técnica MALDI-TOF MS.

Figura 3 - Princípios do funcionamento da tecnologia de espectrometria de massa por ionização/ dessorção de matriz assistida por laser por tempo de voo (MALDI-TOF MS).



Fonte: Adaptado de Viana *et al.*, 2019; Kliem *et al.*, 2012; Clark *et al.*, 2013.

4 CONCLUSÃO

O mel e o pólen produzidos por meliponíneos possuem características sensoriais, físicas e químicas muito distintas quando comparadas aos da abelha *Apis mellíferas*. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a umidade para mel de abelhas sem ferrão pode variar de 23 a 37,5 %; a acidez total valor máximo de 98,43 meq kg⁻¹; e açúcares redutores de 75,5 %. Os parâmetros físico-químicos estabelecidos pelo *Codex Alimentarius/2020* e Instrução Normativa N° 11/2000, fazem referência apenas ao mel de abelhas *Apis mellífera* e determina 20 % de umidade; 50 meq kg⁻¹ de acidez total; e 65 % de açúcares redutores. As amotras de pólen das abelhas sem ferrão possuem alto teor de umidade variando de 37,12 a 53,93 %; proteínas de 19,7 a 37,63%; lipídeos de 2,5 a 10,81 %; algumas espécies apresentam quantidade de fibras considerável. A utilização generalizada dos parâmetros físico-químicos estabelecidos para o mel e o pólen de abelhas *Apis mellífera* pode acarretar problemas para comercialização dos produtos de espécies sem ferrão, visto que este mel possui características físico-químicas muito diferentes.

A microbiota associada ao pólen e o mel das abelhas *Meliponini* ainda é pouco estudada, no entanto, a interação microbiana pode ser observada por meio da fermentação destes alimentos que são armazenados dentro das colônias. Estes microrganismos podem contribuir na nutrição das abelhas, produzir substâncias que podem auxiliar na transformação de produtos como o néctar e o pólen; assim como podem produzir compostos antimicrobianos que têm a finalidade de inibir o crescimento de patógenos dentro da colônia.

Os resultados mostram a presença de coliformes, bolores e leveduras em diferentes amostras de méis de abelhas sem ferrão. A presença destes microrganismos pode ser proveniente da microbiota do pólen, do néctar, da abelha e/ou inadequadas condições higiênicas sanitárias durante a manipulação e processamento do produto.

As leveduras identificadas no mel de abelhas sem ferrão foram *Starmerella meliponinorum*, *Metschnikowia* sp., *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces rosei*, *Lachancea fermentati*, *Pichia anomala*, *Pichia kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Dekkera bruxellensis*, e *Kloeckera africana*. No pólen foram identificadas bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, leveduras como *Starmerella*, *Candida*, *Hyphopichia*, *Kodamaea*, *Pichia*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces* e os fungos *Penicillium* e *Talaromyces*. Os fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Talaromyces* também foram identificados no mel, no pólen, e no interior dos ninhos das abelhas.

As bactérias ácido lácticas encontradas são capazes de produzir compostos antimicrobianos e enzimas que são industrialmente importantes por conferir benefício à saúde. As leveduras secretam enzimas que participam dos processos bioquímicos que contribuem na transformação do pólen apícola em pólen fermentado, tornando os nutrientes biodisponíveis, e melhorando qualidade nutricional do alimento.

Poucos trabalhos abordam sobre as características físico-químicas e a biodiversidade microbiológica do mel e do pólen das abelhas sem ferrão. Sendo importante o desenvolvimento de novas pesquisas para a construção de novos conhecimentos, visando fornecer dados científicos para embasamento de uma legislação específica para definir o padrão de identidade e qualidade destes produtos, bem como contribuir para o conhecimento da diversidade microbiana e a aplicação dos microrganismos identificados.

REFERÊNCIAS

- ADAB. **Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel de Abelha social sem ferrão, gênero *Melipona* (pp. 1-9), Bahia, Brasil: Portaria ADAB N° 207 DE 21/11/2014, 2014.
- AKCAN N. Produção de alto nível de α -amilase extracelular de *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 em fermentação submersa. **ROM. Biotecnologia. Lett.** 2011; 16 :6833-6840.
- AL GHAMDI, A. A.; KHAN, M. J.; ANSARI, S. B.; ALMASAUDI, S.; AL KAHTANI, S. Effect of gut bacterial isolates from *Apis mellifera jemenitica* on *Paenibacillus larvae* infected bee larvae. **Saudi J. Biol. Sci**, 25 (2018), pp. 383-387.
- ALMEIDA ANACLETO, D. **Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo**. 2007.134 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- ALMEIDA MURADIAN, L. B.; STRAMM, K. M.; HORITA, A.; et al. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698–1706, 2013.
- ALMEIDA MURADIAN, K. M.; STRAMM, L. M. Efficiency of the FT-IR TR spectrometry for the prediction of the physicochemical characteristics of *Melipona subnitida* honey and study of the temperature's effect on those properties. **International Journal of Food Science and Technology**, 49 (1) (2014), pp. 188-195.
- ALMEIDA MURADIAN, L. B. DE; MATSUDA, A. H. Physicochemical Parameters of Amazon *Melipona* Honey. **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 707–708, 2007.
- ALQARNI, A. S.; OWAYSS, A. A.; MAHMOUD, A. A.; HANNAN, M. A. Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 618–625, 2014.
- ALVES, R. M. O; SODRÉ, G. S.; CARVALHO, C. A. L. 2018. Chemical, Microbiological, and Palynological Composition of the ‘Samburá’ *Melipona scutellaris*. p.360. In: Vit, P.; Pedro. S.R.M.; Roubik, D. (eds). Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology, New York: Springer.
- ALVES, R. M. O.; CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (*Hymenoptera:Apidae*). **Food Science and Technology**, v. 25, p. 644-650, 2005.
- ALVES, T. T. L.; MENESES, A.R. V.; SILVA, J. N.; PARENTE, G. D. L.; HOLANDA NETO, J. P. Caracterização físico-química e avaliação microbiológica de méis de abelhas nativas do Nordeste brasileiro. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 3, p. 91-97, 2011.

- ANACLETO, D. D. A.; SOUZA, B. D. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. D. C. C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula*, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 535–541, 2009.
- ANDRADE, M. J.; CÓRDOBA, J. J.; CASADO, E. M.; CÓRDOBA, M. G.; RODRÍGUEZ, M. (2010). Effect of selected strains of *Debaryomyces hansenii* on the volatile compound production of dry fermented sausage “salchichón”. **Meat Science**, 85, 256–264.
- AQEEL, B. M.; UMAR, D. M. Efeito de fontes alternativas de carbono e nitrogênio na produção de alfa-amilase por *Bacillus megaterium*. **Mundial Appl. Sci. J.** 2010; 8 :85-90.
- ARES, A. M.; VALVERDE, S.; BERNAL, J. L.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. Extração e determinação de compostos bioativos de pólen de abelha. **J. Farmácia. Biomédico**. Anal. 2018; 147:110-124.
- AROUCHA, E. M. M. **Mel de abelha do Rio grande do Norte: qualidade física - química - sensorial - potencial antioxidante**. Mossoró, 2012. 80p.
- AROUCHA, E. M. M., DE OLIVEIRA, A. J. F., NUNES, G. H. S., MARACAJÁ, P. B., & SANTOS, M. C. A. (2008). Qualidade do mel de abelha produzidos pelos Incubados da iagram e comercializado no Município de Mossoró/RN. **Revista Caatinga**, 21(1), 211-217.
- ASAMA T., ARIMA TH, GOMI T., KEISHI T., TANI H., KIMURA Y., TATEFUJI T., HASHIMOTO K. *Lactobacillus kunkeei* YB38 de produtos de abelhas aumenta a produção de IgA em adultos saudáveis. **J. Appl. Microbiol.** 2015; 119:818-826.
- ÁVILA, S.; HORNUNG, P. S.; LOPESTEIXEIRA, G.; et al. Mel de mandaçaia - *Melipona quadrifasciata* (Lepeletier): parâmetros físico-químicos e espectro polínico. **Embrapa Florestas Comunicado Técnico**, v. 378, n. 1, p. 1–6, 2016.
- ÁVILA, S.; BEUX, M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health- promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 81, n. August, p. 37–50, 2018.
- BALLIVIAN, P. J. M. P. (2008) **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo, Oikos.
- BARBOSA, R. N.; BEZERRA, J.; SOUZA MOTTA, C.; SEVERO GOMES, B.; COSTA, C.; MELO, H. Prospecção on Yeasts from Stingless Bees Honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga). **Gaia Scientia**, [S. l.], v. 10, n. 4, 2016.
- BARBOSA, R. N.; et al. Phylogenetic analysis of *Monascus* and new species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 29-51, 2017.
- BARBOSA, R. N.; BEZERRA, J. D. P.; SOUZA MOTTA, C. M.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A.; OLIVEIRA, N. T.; HOUBRAKEN, J. New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2018, 111:1883-1912.
- BARRIGA, E. J. C.; LIBKIND, D.; BRIONES, A. I.; IRAN, O.; PORTERO, P.; ROBERTS, I.; JAMES, S.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. **Yeasts biodiversity and its significance: case**

studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In: GRILLO, O.; VENORA, G. (eds). *Changing Diversity in Changing Environment*. InTech – Open Access Company, 55– 86p (2011).

BELAY, A.; HAKI, G. D.; BIRRINGER, M.; et al. Rheology and botanical origin of Ethiopian monofloral honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 393–401, 2017.

BILUCA, F. C.; BETTA, F. DELLA; OLIVEIRA, G. P.; et al. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244–249, 2014.

BILUCA, F. C.; BRAGHINI, F.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61–69, 2016.

BISWAS, S.; ROLAIN, J. M. Uso de espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de bactérias difíceis de cultivar. **J. Microbiol. Métodos**, 92 (1) (2013), pp. 14-24.

BOLUMAR, T.; SANZ, Y.; ARISTOY, M. C.; TOLDRÁ, F. (2008). Purification and characterisation of proteases A and D from *Debaryomyces hansenii*. **International Journal of Food Microbiology**, 12, 135–141.

BRASIL. Instrução Normativa N° 03, de 19 de janeiro de 2001. Regulamento Técnicos de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola. **Diário Oficial da União. Legislação de Produtos Apícolas Derivados. Abastecimento**. p. 23, 2001.

BRASIL. Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União. Legislação de Produtos Apícolas Derivados. Abastecimento**. p. 23, 2000.

BRODSCHNEIDER, R.; CRAILSHEIM, K. Nutrition and health in honey bees. **Apidologie**, v.41, n.3., p. 278-294, 2010.

BRYSCH HERZBERG, M. Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 50, n. 2, p. 87–100, 2004.

CAMARGO, J. M. F.; PEDRO, S. R. M. *Meliponini Lepeletier*, 1836. Em MOURE, J.S.; URBAN, D.; MELO, G.A.R (Orgs). *Catálogo das Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) na Região Neotropical - versão online* (2013).

CAMARGO, R. C. R.; OLIVEIRA, K. L.; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 20, p. 2-6, 2017.

CAMPOS, M. G. R.; FRIGERIO, C.; LOPES, J.; & BOGDANOV, S. (2010). What is the future of Bee-Pollen? **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, 2(4), 131–144.

CARBONELLE, E.; NASSIF, X. Application of MALDI-TOF-MS in clinical microbiology laboratory. **Medical Sciences**, Paris, v. 10, p. 882-888, Oct. 2011.

CARBONELLE et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 1, p. 104-109 jan. 2011.

CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; VÉRAS, S. O.; ALVES, E. M.; SODRÉ, G. S. M. Proposta de regulamento técnico de qualidade físico-química do mel floral processado produzido por abelhas do gênero *Melipona*. 1-9. En VIT P e

ROUBIK DW. (eds). **Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots**. 2013.

Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela.

CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**, Cruz das Almas: Bahia, 2005.

CARVALHO, C. A. L.; SODRE, G. S.; FONSECA, A. A. O.; ALVES, R. M. O.; SOUZA, B. A.; CLARTON, L. 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, n. 1, p. 143–149, 2009.

CARVALHO, A.T.; ZANELLA, F. C. V. Espécies de abelhas sem ferrão criadas no estado do Rio Grande do Norte. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; KOEDAM, D.;

HRNCIR, M. **A abelha jandaíra no passado, no presente e no futuro**, Mossoró, EDUFERSA, 2017. pp. 41-72.

CHANG, S.; CARNEIRO LEÃO, M. P.; OLIVEIRA, B. F.; SOUZA MOTTA, C.; LIMA, N.; SANTOS, C.; OLIVEIRA, N. T. Abordagem polifásica incluindo análise MALDI-TOF MS/MS para identificação e caracterização de *Fusarium verticillioides* em Grãos de milho brasileiros. **Toxinas**. 2016; 8:54 .

CHATONNET, P.; VIALA, C.; DUBORDIEU, D. Influence of polyphenolic components of red wines on the microbial synthesis of volatile phenols. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, p. 443-448, 1997.

CHIKANO, M.; TAKAHASHI, J. I. **Sequência completa de DNA mitocondrial da levedura *Zygosaccharomyces siamensis* (*Saccharomyces: Saccharomycetales*) de mel fermentado de *Apis cerana japonica* no Japão**. DNA mitocondrial Parte B Res, 5 (2020) , pp . 2645-2647.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (*Apidae:Meliponini*) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2016.

CINTAS, L M.; CASAUS, M. P.; HERRANZ, C.; NES, I. F.; HERNANDEZ, P. E. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. **Food Sci Tech Int**, 7:281–305, 2001.

CLARK, a. E.; KALETA, J.; ARORA, A.; WOLK, D. M. Ionização por dessorção a laser assistida por matriz – espectrometria de massa de tempo de voo: uma mudança fundamental na prática rotineira da microbiologia clínica. **Clin. Microbiol. Rev**, 26 (2013) , pp. 547–603.

Codex Alimentarius Commission. Codex Alimentarius Commission Standards. **Codex CXC 1-1969**, p. 1–8, 2020.

CONTERNO, L.; JOSEPH, L. C. M.; ARVIK, T. J.; HENICK KLING, T.; BISSON, L. F. Genetic and physiological characterization of *Brettanomyces bruxellensis* strains isolated from wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, Geneva, v. 57, n. 2, p. 139-147, 2006.

COSTA NETO D. J.; MORAIS P. B. The vectoring of *Starmerella* species and other yeasts by stingless bees in a neotropical savanna. **Fungal Ecol**, 2020, 47:100973.

COSTA, A. C. V.; SOUSA, J. M. B.; SILVA, M. A. A. P.; GARRUTI, D. DOS S.; MADRUGA, M. S. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the Brazilian semi-arid region. **Food Research International**, 2017.

COSTA NETO, D.J; OLIVEIRA, D. P.; MORAIS, P. B. 2016. Leveduras associadas a abelha *Tubi* bravo e aos produtos do ninho em sistemas de meliponicultura. **Ciencia & Tecnologia**: edição especial.

CRAFACK, M., MIKKELSEN, M. B., SAERENS, S., KNUDSEN, M., BLENNOW, A., LOWOR, S., TAKRAMA, J., SWIEGERS, J. H., PETERSEN, G. B., HEIMDAL, H., & NIELSEN, D. S. (2013). Influencing cocoa flavour using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International journal of food microbiology**, 167(1), 103–116.

CRANE, E. **O Livro Do Mel**. São Paulo: Editora Nobel, 1983. 226p. LENGLER, Silvio. Inspeção e Controle de Qualidade do Mel. 2007.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 36, n. 2, p. 380-407, Mar. 2012.

CRUZ, T. M. L.; COUTO, F. M. M.; FRANÇA, G. S.; LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P. **Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro**. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão (2009).

DANIEL, H. M.; ROSA, C. A.; THIAGO CALAÇA, P. S. S.; ANTONINI, Y.; BASTOS, E. M. A. F.; EVRARD, P.; HURET, S.; FIDALGO JIMÉNEZ, A.; LACHANCE, M. *A. Starmerella neotropicalis* fa, sp. nov., uma espécie de levedura encontrada em abelhas e pólen do Brasil e Cuba. **Int. J. Syst. Evoluir Microbiol.** 2013; 63 :3896–3903.

DAVID, C. S.; NOGUEIRA, V. R.; RONQUI, L.; LISBOA, F. T.; OLIVEIRA, D. F. de. Hygienic and sanitary quality of honey produced by *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* and the need for regulatory standard. **Scientia Agraria Paranaensis**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 107–111, 2017.

DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; SPANU, T.; FIORI, B.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Aplicação da espectrometria de massa MALDI-TOF em microbiologia diagnóstica clínica. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 8 (2014), pp . 1081-1088.

DÍAZ, S.; URBANO, S. S.; CAESAR, L.; BLOCHTEIN, B.; SATTLER, A.; ZUGE, V.; HAAG, K. L. Report on the microbiota of *Melipona quadrifasciata* affected by a recurrent disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 143, 2017, p. 35-39.

DOUGLAS, A. E. Multiorganismal Insects: Diversity and Function of Resident Microorganisms. **Annu Rev Entomol**, v. 60, p. 17–34, 2015.

DUARTE, A. W. F. **Biodiversidade de leveduras derivadas de ecossistemas Antárticos marinhos e terrestres e prospecção de lipases**. 177f. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

DURÁ, A.; FLORES, M.; TOLDRÁ, F. (2002). Purification and characterization of a glutaminase from *Debaryomyces hansenii* sp. **International Journal Food Microbiology**, 76, 117-126.

ELIAS SANTOS, D.; FIALHO, M. D. C. Q.; VITORINO, R.; et al. Proteome of the head and thorax salivary glands in the stingless bee *Melipona quadrifasciata* anthidioides. **Apidologie**, v. 44, n. 6, p. 684–698, 2013.

ENCINAS, J. P.; LOPES-DÍAZ, T. M.; GARCIA LOPEZ, A. O.; MORENO, B. (2000). Yeast populations on Spanish fermented sausages. **Meat Science**, 54, 203-208

ENGEL, P.; MARTINSON, V. G.; MORAN, N. A. Diversidade funcional na microbiota intestinal simples da abelha. **Proc. Nacional Acad. Sci. EUA**. 2012; 109 :11002–11007.

ESCUREDO, O.; DOBRE, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. C. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90, 2014.

ESTEVINHO, L. M.; RODRIGUES S.; PEREIRA, A. P.; FEÁS, X. 2012. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. **International Journal of Food Science and Technology**, 47:429-435.

FERNANDES, R. T.; ROSA, I. G.; CONTI SILVA, A. C. Características microbiológicas e físico-químicas de méis de abelha *Melipona fasciculata* produzidos em duas regiões do Brasil. **Ciencia Rural**, v. 48, n. 05, p. 1–8, 2018.

FERNANDEZ ESPINAR, M. T.; MATRORELL, P.; DE LLANOS, R.; QUEROL, A. Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In: QUEROL, A.; FLEET, G.H. (Ed.). The yeast handbook-yeasts in food and beverages. Berlin. **Springer-Verlag**, 2006. p. 55-82.

FERREIRA CALIMAN, M. J.; SILVA, C. I.; MATEUS, S.; ZUCCHI, R.; NASCIMENTO, F. S. Neutral Sterols of Cephalic Glands of Stingless Bees and Their Correlation with Sterols from Pollen. **Pyche**, 7, 2012.

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.

FLEET, G.H. Wine yeasts for the future. **FEMS Yeast Research**, v.8, p.979-995, 2008.

FRANCESCA, N.; CHIURAZZI, M.; ROMANO, R.; APONTE, M.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Indigenous yeast communities in the environment of ‘‘Rovello bianco’’ grape variety and their use in commercial white wine fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 337-351, 2010.

FREITAS, B. M. **Meliponíneos. A vida das abelhas**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, CD-ROM (2003).

FUENMAYOR, C. A.; ZULUAGA-DOMÍNGUEZ, C. M.; DÍAZ-MORENO, A. C.; QUICAZÁN, M. C. Miel de angelita’: Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. **Interciencia**, v. 37, n. 2, p. 142–147, 2012.

GILLIAM, M.; RUBIK, D.; LORENZ, B. Microorganismos associados com pólen, mel e provisões de ninhada no ninho de uma abelha sem ferrão, *Melipona fasciata*. **Apidologia**. 2000; 21 :89-97.

GILLIAM, M. Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. **FEMS Microbiol Lett**, 1997, 155:1-10.

GONÇALVES, P.; GONÇALVES, C.; BRITO, P. H.; SAMPAIO, J. P. 2020. O clado *Wickerhamiella* / *Starmerella* um tesouro para o estudo da evolução do metabolismo das leveduras. **Levedura**, 37:313-320.

HERRERA, C. M.; POZO, M. I.; MEDRANO, M.; 2013. Yeasts in nectar of an early-blooming herb: sought by bumble bees, detrimental to plant fecundity. **Ecology**, 94, 273-279.

HOLANDA, C. A.; BRANDÃO, C. M.; SOUZA, J. L., JL, R.; MN, D. S., ALVES, L. M. C.; e COSTA, M. C. P. Quality and estimative of time-consuming of tiúba honey (*Melipona fasciculata* Smith) produced in cerrado region from Maranhão State, Brasil. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, n. 3, p. 53, 2015.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* smith da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 55-58, 2012.

HRNCIR, M.; JARAU, S.; BARTH, F. G. Stingless Bees (*Meliponini*): Senses and Behavior. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 202, n. 9–10, p. 597–601, 2016.

JAMES, S.; E STRATFORD, M. (2011). " *Zygosaccharomyces* Barker (1901) ", em *The Yeasts, A Taxonomic Study*. (eds). Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. Nova York: NY: Elsevier Science Publishers, 937-947.

JIMENEZ, M.; et al. Physicochemical and antioxidant properties of honey from *Scaptotrigona mexicana* bee. **Journal of Apicultural Research**, v. 55, n. 2, p. 151-160, 2016.

KIELISZEK, M.; PIWOWAREK, K.; KOT, AM.; BŁAZEJAK, S.; CHLEBOWSKA ŚMIGIEL, A.; WOLSKA, I. Pólen e pão de abelha como novos produtos orientados para a saúde: Uma revisão. **Tendências Food Sci. Tecnol.** 2018; 71 :170-180.

KLIEM, M; SAUER, S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. **Current Opinion in Microbiology**, p. 397-402. 2012.

KOMOSINSKA VASSEV, K.; OLCZYK, P.; KAZMIERCZAK, J.; MENCNER, L.; OLCZYK, K. (2015). Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, 2015, 297425.

KOSTIC, A. Z.; PESIC, M. B.; MOSIC, M. D.; DOJCINOVIC, B. P.; NATIC, M. M.; TRIFKOVIC, J. D. 2015. Mineral content of bee pollen from Serbia. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, 66:251-258.

KUROISHI, A. M. et al. Evaluation of honey crystallization from the colour and water activity parameters. **Brazilian Journal Food Technology**. Campinas, v. 15, n. 1, p. 84-91, 2012.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 331–371, 1998.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). **The Yeasts**. Fifth ed. [s.l.] Elsevier B.V, 2011. p. 3–5.

LACHANCE, M. A.; al. *Candida cleridarum*, *Candida tilneyi* and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1201-1207, 2001.

LAGE, L. G. A.; COELHO, L. L.; RESENDE, H. C.; et al. Honey physicochemical properties of three species of the Brazilian *Melipona*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 84, n. 3, p. 605–608, 2012.

LEMOS, M. S.; VENTURIERI, G. C.; DANTAS FILHO, H. A.; DANTAS, K. G. F. Evaluation of the physicochemical parameters and inorganic constituents of honeys from the Amazon region. **Journal of Apicultural Research**, v. 8839, n. July, p. 1–10, 2017.

LI, E.; LIU, A.; XUE, B.; LIU, Y. Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2475–2482, 2011.

LIMA NETO, R.; et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolate culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. Fatores que afetam a fermentação do etanol usando *Saccharomyces cerevisiae* BY4742.

Biomass Bioenergy, 47 (2012), pp. 395-401.

MADDEN, A. A.; EPPS, M. J.; FUKAMI, T.; IRWIN, R. E.; SHEPPARD, J.; SORGER, D. M.; DUNN, R. R. 2018. A ecologia das relações inseto-levedura e sua relevância para a indústria humana Proc. **R. Soc. B.** 285.

MAIA SILVA, C.; et al. Survival strategies of stingless bees (*Melipona subnitida*) in an unpredictable environment, the Brazilian tropical dry forest. **Apidologie**, v. 46, n. 5, p. 631-643, 2015.

MAIER, T.; et al. Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. **Nature Methods**, London, v. 3, Mar. 2006.

MALFEITO FERREIRA M. Duas Décadas de Mancha de “Suor de Cavalo” e Leveduras *Brettanomyces* no Vinho: Onde Estamos Agora? **Beverage Sensory Modification**, 2018; 4(2):32.

MASOUD, W.; JAKOBSEN, M. (2005). The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. **International Dairy Journal**, 15, 69-77.

MASSARO, F. C.; GILL, L.; TARLINTON, B.; HAUXWELL, C. (2018) **Yeasts associated with nests of Australian stingless bees (*Meliponini*)**. In **2018 International Congress of Invertebrate Pathology and Microbial Control and the 51st Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology**. 2018-08-12 - 2018-08-16.

MATOS, T. T. S.; TEIXEIRA, J. F.; MACIAS, L. G.; SANTOS, A. R. O.; SUH, S. O.; BARRIO, E.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. (2020). *Kluyveromyces osmophilus* não é sinônimo de *Zygosaccharomyces mellis*; reintegração como *Zygosaccharomyces osmophilus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 70 (5): 3374 – 3378.

MAYORAL, T. N.; ANDRÉS, A. G. A.; CARRETERO, S. F.; FERNÁNDEZ, R. C.; PAJARES, M. S. J. (2018). Cervicofacial lymphadenitis due to *Mycobacterium mantenii*: rapid and reliable identification by MALDI-TOF MS. **New Microbes and New Infections**, 22:01-03.

MCFREDERICK, Q. S.; WCISLO, W. T.; TAYLOR, D. R.; ISHAK, H. D.; DOWD, S. E.; MUELLER, U. G. Ambiente ou parentesco: De onde as abelhas obtêm bactérias acidófilas? **Mol. Eco**, 2012; 21 :1754-1768.

MEIRELES, S. D. F. **Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae:Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos**. 81f. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

MELO GAR: **Stingless bees (*Meliponini*)**. In Encyclopedia of Social Insects. Edited by Starr C. Springer; 2020:1-18.

MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n.1, p. 89-99, 2003.

MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ, D. C.; MELO, W. G. P.; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D.; NASCIMENTO, F. S.; PUPO, M. T. Meliponamycins: antimicrobials from stingless bee-associated *Streptomyces* sp. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 610-616, 2020.

MENEZES, C.; VOLLET-NETO, A.; CONTRERA, F.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. The Role of Useful Microorganisms to Stingless Bees and Stingless Beekeeping. In: Pot-Honey: A legacy of stingless bees. 1. ed. New York 2013: **Springer Science and Business Media**, p. 153–171, 2013.

MENON, V.; PRAKASH, G.; RAO, M. (2010). Enzymatic hydrolysis and ethanol production using xyloglucanase and *Debaromyces hansenii* from tamarind kernel powder: Galactoxyloglucan predominant hemicelluloses. **Journal of Biotechnology**, 148, 233-239.

MICHENER, C. D. **Comparative Social Behavior of Bees**. Annual Review of Entomology, v. 14, n. 1, p. 299–342, 1969.

MICHENER, C.D. **The social behavior of the bees**. Harvard University Press, Massachusetts (1974).

MICHENER, C.D., 2013. The Meliponini. In: VIT, P., PEDRO, S.R.M., ROUBIK, D.W. (eds). Pot-Honey: a legacy of stingless bees. **Springer Science**, New York, p. 3-17.

MIRANDA, L. T. V. **Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em dietas para Lambaris-Dorabo-Amarelo (*Astyanax altiparanae*)**. 2012. 48 F. Dissertação de mestrado em biologia e manejo animal) – Universidade de Viçosa, 2012.

MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD AB RASHID, N. K.; ZAWAWI, N. Pólen Coletado por Abelhas Sem Ferrão (Pão de Abelha): Propriedades Químicas e Microbiológicas e Benefícios para a Saúde. **Moléculas**, 2021, 26, 957.

MOHAMMAD, S. M.; MAHMUD AB-RASHID, N. K.; ZAWAWI, N. Propriedades probióticas de bactérias isoladas de pão de abelha de abelha sem ferrão *Heterotrigona itama* . **J. Apic. Res.** 2020; 1–16.

MONTES DE OCA, R.; SALEM, A. Z. M.; KHOLIF, A. E.; MONROY, H.; PÉREZ, L. S.; ZAMORA, J. L.; GUTIÉREZ, A. Yeast: Description and Structure. In A. Z. M. Salem, A. E. Kholif, e A. K. Puniya. (eds). Yeast additive and animal production. India. **PubBioMed Central Research Publishing Service**, p. 4-13, 2016.

MUKHERJEE, V.; STEENSELS, J.; LIEVENS, B.; VOORDE, I. V. V.; VERPLAETSE, A.; AERTS, G.; WILLEMS, K. A.; THEVELEIN, J. M.; VERSTREPEN, J. M.; RUYTERS, S. Avaliação fenotípica de leveduras *Saccharomyces* naturais para diferentes características

desejáveis na produção industrial de bioetanol. **Appl Microbiol Biotechnol.** 98, 9483-9498 (2014).

NACEF, M.; CHEVALIER, M.; CHOLLET, S.; DRIDER, D.; FLAHAUT, C. (2017) MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the Maroilles. **Int J Food Microbiol** 247:2–8.

NASCIMENTO, A.; MARCHINI, L.; CARVALHO, C.; et al. Physical-Chemical Parameters of Honey of Stingless Bee (*Hymenoptera:Apidae*). **American Chemical Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 139–149, 2015.

NGALIMAT, M. S.; ABD, R. N. Z. R.; RAJA, A. B. D.; RAHMAN, R. N. Z.; YUSOF, M. T.; SYAHIR, A.; SABRI, S. Characteris ation of bacter ia isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama* , honey, bee b read and propolis. **Peer J**, 2019, 7.

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

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: A reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **Afr Health Sci**, v. 7, p. 159–165, 2007.

OLESEN, P. T.; STAHNKE, L. H. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. **Meat Sci.** 2000, 56(4):357-368.

OLIVEIRA, M. M. E.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P.; ROMEO, O.; ALMEIDA PAES, R.; PAIS, C.; LIMA, N.; ZANCOPE OLIVEIRA, R. M. Desenvolvimento e otimização de um novo protocolo MALDI-TOF para identificação do *Sporothrix* complexo de espécies. **Res. Microbiol.** 2015; 166:102-110.

OLIVEIRA, K. A. M.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. V. Caracterização microbiológica, físico-química e microscópica de Abelhas Canudo (*Scaptotrigona depilis*) e Jataí (*Tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 66, p. 239–248, 2013.

PALUDO, C. R.; MENEZES, C.; SILVA JUNIOR, E. A.; et al. 2018. Larvas de abelhas sem ferrão exigem esteróide fúngico para pupar. **Sci Rep**, 8 , 1122 (2018).

PASIAS, I. N.; KIRIAKOU, I. K.; PROESTOS, C. (2017). HMF and diastase activity in honeys: A fully validated approach and a chemometric analysis for identification of honey freshness and adulteration. **Food chemistry**, 229, 425–431.

PAULA, G. T.; MENEZES, C.; PUPO, T. M.; ROSA, A.C. Stingless bees and microbial interactions. **Current Opinion in Insect Science** 2021, 44:41–47.

PASSARINI, M. R. Z.; SANTOS, C.; LIMA N.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Fungos filamentosos da esponja marinha do Atlântico. **Dragmacidon reticulatum**. **Arco. Microbiol.** 2013; 195 :99-111.

- PEDRO, S. R. D. M. The stingless bee fauna in Brazil (*Hymenoptera:Apidae*). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.
- PERANTONI, L. M.; QUEIROZFERNANDES, G. M. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. **Salusvita**, Bauru, v. 38, n. 2, p. 529-542, 2019.
- PEREIRA, L.; et al. The use of MALDI-TOF MS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 32, n. 1, p. 11-17, ene. 2014.
- PETERSEN, K. M.; WESTALL, S.; JESPERSEN, L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaceripened cheeses. **Journal Dairy Science**, 85, 478-486.
- POPOVIC, N. T., KAZAZIC, S. P., STRUNJAK PEROVIV, I., COZ-RAKOVAC, R. 2017. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. **Environ. Res.** 152, 7–16.
- PORTER, T. M.; GOLDING, G. B. 2012. Factors that affect large subunit ribosomal DNA amplicon sequencing studies of fungal communities: Classification method, primer choice, and error. **PLoS ONE**, 7(4): 1–12.
- POZO, M. I.; LIEVENS, B.; JACQUEMYN. 2014. Impact of microorganisms on nectar chemistry, pollinator attraction and plant fitness. in: Peck, R.L. (eds). *Nectar: Production, Chemical Composition and Benefits to Animals and Plants*. New York: **Nova Science Publishers**, 1-45.
- PRAKASH, G.; VARMA, A.J.; PRABHUNE, A.; SHOUCHE, Y.; RAO, M. (2010). Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicelluloses using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, 102, 3304-3308.
- RADECKA, D.; MUKHERJEE, V.; MATEO, R. Q.; STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ MORENO M. R.; THEVELEIN, J. M. Olhando além de *Saccharomyces*: o potencial de espécies de leveduras não convencionais para características desejáveis na fermentação de bioetanol. **FEMS Levedura Res**, 2015; 15-53.
- RAMOS, C. L.; MAGALHÃES GUEDES, K. T. (2021a). Preparando Suspensão de Levedura por Diluição em Série para e enumeração. Em: MAGNANI, M. (eds). *Detecção e Enumeração de Bactérias, Leveduras, Vírus e Protozoários em Alimentos e Água Doce. Métodos e Protocolos em Ciência de Alimentos*. **Humana**, Nova York, NY.
- RAMOS, C. L.; MAGALHÃES GUEDES, K. T. (2021b). Detecção e Quantificação de Espécies de Leveduras em Amostras de Alimentos para Controle de Qualidade. Em: MAGNANI, M. (eds). *Detecção e Enumeração de Bactérias, Leveduras, Vírus e Protozoários em Alimentos e Água doce. Métodos e Protocolos em Ciência de Alimentos*. **Humana**, Nova York, NY.

RAMOS, O. Y.; BASUALDO, M.; LIBONATTI, C.; VEGA, M. F. Situação atual e aplicação de bactérias lácticas em sistemas de produção animal com foco em bactérias de colônias de abelhas. **J. Appl. Microbiol.** 2020; 128:1248-1260.

RAO, P. V.; KRISHNAN, K. T.; SALLEH, N.; GAN, S. H. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 5, p. 1–8, 2016.

REBELO, K. S.; FERREIRA, A. G.; CARVALHO ZILSE, G. A. Physicochemical characteristics of pollen collected by Amazonian stingless bees. **Ciência Rural**, Santa Maria. 46 (5): 927-932 (2016).

RENOUF, V.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. Inventory and monitoring of wine microbial consortia. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 1, p. 149-164, 2007.

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

RODRIGUEZ HERNANDEZ, D.; MELO, W. G. P.; MENEGATTI, C.; LOURENZON, V. B.; NASCIMENTO, F. S.; PUPO, M. T. Actinobacteria associated with stingless bee biosynthesis bioactive polyketides against bacterial pathogen. **New J Chem**, 2019, 43.

ROSA, C. A.; LACHANCE, M. A. 2005. “*Zygosaccharomyces machadoi* sp. N., Uma espécie De Levedura Isolada De Um Ninho Da Abelha Sem ferrão *Tetragonisca angustula*”. Lundiana: **International Journal of Biodiversity** 6 (sup.):27-29.

ROSA, C.; LACHANCE, M.A.; SILVA, J.O.C.; TEIXEIRA, A.C.; MARINI, M.M.; ANTONINI.; MARTINS, R.P. Yeast communities associated with stingless bees. **FEMS Yeast Research**, 4, 271-275 (2003).

ROULSTON, T. H.; CANA, J. H. Conteúdo nutricional e digestibilidade do pólen para animais. **Plant Syst. Evoluir**, 2000, 222, 187-209.

ROZANSKA, H.; OSEK, J. Effect of storage on microbiological quality of honey. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 56, n. 2, p. 161–163, 2012.

SAKSINCHAI, S.; SUZUKI, M.; CHANTAWANNAKUL, P.; OHKUMA, M.; LUMYONG, S. A novel ascosporegenous yeast species, *Zygosaccharomyces siamensis*, and the sugar tolerant yeasts associated with raw honey collected in Thailand. **Fungal Diversity**, v. 52, p. 123–139, 2012.

SANCHO M. T.; et al. Nonaromatic organic acids of honeys. In: VIT, P.; et al. (eds). **Pot-honey: A legacy of stingless bees**. New York, 2013, p. 447-458.

SANDRIN, L.; FOURQUET, B.; HASQUENOPH, J. M.; YON, S.; FOURNIER, C.; MAL, F.; CHRISTIDIS, C.; ZIOL, M.; POULET, B.; KAZEMI, F.; et al. Elastografia transitória:

um novo método não invasivo para avaliação da fibrose hepática. **Ultrassom Med Biol.** 2003; 29:1705-1713.

SANTOS, A. R. O.; LEON, M. P.; BARROS, K. O.; FREITAS, L. F. D.; HUGHES, A. F. S.; MORAIS, P. B.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. *Starmerella camargoi* f.a., sp. nov., *Starmerella ilheusensis* f.a., sp. nov., *Starmerella litoralis* f.a., sp. nov., *Starmerella opuntiae* f.a., sp. nov., *Starmerella roubikii* f.a., sp. nov. and *Starmerella vitae* f.a., sp. nov., isolated from flowers and bees, and transfer of related *Candida* species to the genus *Starmerella* as new combinations. **Int J Syst Evol Microbiol**, 2018, 68.

SEIJO, M. C.; ESCUREDO, O.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. Fungal diversity in honeys from northwest Spain and their relationship to the ecological origin of the product. **Grana**, v. 50, n. 1, p. 55–62, 2011.

SILVA, M. S.; RABADZHIEV, Y.; ELLER, M. R.; ILIEV, I.; IVANOVA, I.; SANTANA, W. C. Microorganisms in Honey. In: TOLEDO, V. A. A. **Honey Analysis**. IntechOpen, 2017.

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

SILVA, T. M. S.; SANTOS, F. P. DOS; EVANGELISTA RODRIGUES, A.; et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10–18, 2013.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, v.10, p. 146-152, 2012.

SIMONE FINSTROM, M.; SPIVAK, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. **Apidologie**, v. 41, n. 3, p. 295–311, 2010.

SINACORI, M.; FRANCESCA, N.; ALFONZO, A.; CRUCIATA, M.; SANNINO, C.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Cultivable microorganisms associated with honeys of different geographical and botanical origin. **Food Microbiology**, v. 38, p. 284-294, 2014.

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

SORENSEN, B. B., SAMUELSEN, H. (1996). The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organisms *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. **International journal of food microbiology**, 32(1-2), 59–71.

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

SOUSA, J. M. B.; SOUZA, E. L.; MARQUES,.; et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT - Food Science and Technology*, v. 65, p. 645–651, 2016.

SOUZA, B. D. A.; CARVALHO, C. A. L. DE; SODRÉ, G. D. S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). *Ciência Rural*, v. 34, n. 5, p. 1623–1624, 2004.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; ODA SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. de O. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (*Apidae: Meliponini*) da região Nordeste do Brasil: Características físico-químicas. *Química Nova*, v. 32, p. 303-308, 2009.

STEFANINI, I. Yeast - insect associations : It takes guts. *Yeast*, v. 35, p. 315–330, 2018.

SUPHAPHIMOL, N.; ATTASOPA, K.; PAKWAN, C.; CHANTAWANNKUL, P.; DISAVATHANOOWAT, T. Cultured-dependent and cultured-independent study of bacteria associated with Thai commercial stingless bee *Lepidotrigona terminata*. *J Apic Res*, 2020.

SUZUKI, M.; PRASAD, G. S.; AND KURTZMAN, C. (2011) *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij (1952). In *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed., Vol. 2, ed. by KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. Elsevier, London, pp. 361–371.

SZCZESNA, T. Protein content and amino acid composition of bee collected pollen from selected botanical origins. *J Apic Sci*, 2006, 50 (2), 81-90.

TEIXEIRA, A. C. P.; MARINI, M. M.; NICOLI, J. R.; ANTONINI, Y.; MARTINS, R. P.; ROSA, C. A.; ROSA, C. A. *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 53, p. 339–343, 2003.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composição e funcionalidade do pólen de abelha: Uma revisão. *Tendências Food Sci. Tecnol.* 2020; 98:82-106.

THIAGO CALAÇA, P. S. S. 2011. **Aspectos da biologia de *Melipona quinquefasciata* Lepeletier (Mandaçaia do chão), características físico-químicas do mel, recursos alimentares e leveduras associadas.** Dissertação de mestrado (Ecologia e Biomas tropicais) Universidade Federal do Ouro Preto.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. I. *Microbiologia*, 10ª. edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012.

TSUCHIDA, S., UMEMURA, H., & NAKAYAMA, T. (2020). Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(20), 4775.

USBECK, J. C.; et al. Otimização de parâmetros experimentais e de modelagem para a diferenciação de leveduras deteriorantes de bebidas por espectrometria de massa de tempo de voo de ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) em resposta a diferentes condições de crescimento. *Microbiol Alimentar*. (2013).

- VAN DER WALT, J.: **Dekkera, a new genus of the Saccharomycetaceae**, n. 1, p. 273-280. 1964.
- VÁSQUEZ, A.; OLOFSSON, T. C. As bactérias do ácido láctico envolvidas na produção de pólen de abelha e pão de abelha. **J. Apic. Res**, 2009; 48:189-195.
- VEGA, F.; DOW, P. O papel das leveduras como endossimbiontes de insetos. Em VEGA, F.; BLACKWELL, M. **Associações insetos-fungos: ecologia e evolução**. Nova York: Oxford University Press, 2005.
- VENTURIERI, G. C. **Contribuição para a criação racional de meliponíneos amazônicos**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. 2008. 26 p.
- VIANA, R. O. ; MAGALHÃES GUEDES, K. T.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Use of Maldi-Tof MS biosensor in microbial assessment of Brazilian kefir grains. **Revista Ceres**, v. 66, p. 72-76, 2019.
- VIANA, F.; BELLOCH, C.; VALLÉS, S.; MANZANARES, P. (2011). Monitoramento de um fermento misto de *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* em mosto natural: impacto na produção de 2-fenilacetato de etila. **International Journal of Food Microbiology**, 151 (2), 235-240.
- VIANA, J. L.; FRANCISCO, A. K.; CARVALHO, C. A. L.; WALDSCHMIDT, A. M. Genetic variability in *Melipona scutellaris* from Recôncavo, Bahia, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, p. 3444-3454, 2013.
- VIANA, P. A.; REZENDE, S. T.; FALKOSKI, D. L.; LEITE, T. A.; JOSÉ, I. N.; MOREIRA, M. A.; GUIMARÃES, V. M. (2007). Hydrolysis of oligosaccharides in soybean products by *Debaryomyces hansenii* UFV-1 α -galactosidases. **Food Chemistry**, 103, 331-337.
- VILLAS BÔAS, JERÔNIMO **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2a edição. Brasil, 2018.
- VILLAS BOAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 82, p. 6-16, 2005.
- VIT, P.; SANTIAGO, B.; PEDRO, S. R.; PEREZ-PEREZ, E.; PENA-VERA, M. 2016. Chemical and bioactive characterization of pot-pollen produced by *Melipona* and *Scaptotrigona* stingless bees from Paria Grande, Amazonas State, Venezuela. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 28:78-84.
- WEBER, L.; D GE, C.; HAUFE, G.; HOMMEL, ROLF.; KLEBER, H. P. Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis Apicola*. **Biocatalysis and Biotransformation**, 5, 4, p. 267 – 272. 1992.
- WILLE, A. Biology of the Stingless Bees. **Annual Review of Entomology**, v. 28, n. 1, p. 41–64, 1983.

WOOLFIT, M.; ROZPEĐOWSKA, E.; PISKUR, J.; WOLFE, K. H. Genome survey sequencing of the wine spoilage yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 4, p. 721, 2007.

YAMADA, A.; IZABELA, A.; SANTUCCI, C.; SGARBIERI, C. (2003). Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Revista de Nutrição*. ZHANG, J.; et al. Um método melhorado para análise MALDI-TOF de leveduras associadas ao vinho. **J. Microbiol. Métodos**. (2020).

ZUCCATO, V.; FINOTELLO, C.; MENEGAZZO, I.; PECCOLO, G.; SCHIEVANO, E. Entomological authentication of stingless bee honey by ¹H NMRbased metabolomics approach. **Food Control**, v. 82, p. 145–153, 2017.

Capítulo II

Manuscrito: Diversidade de leveduras em amostras de mel/pólen de abelhas sem ferrão no estado da Bahia-Brasil: Uso da técnica Maldi-Tof/Genbank

Diversidade de leveduras em amostras de mel/pólen de abelhas sem ferrão no estado da Bahia-Brasil: Uso da técnica Maldi-Tof/Genbank

Em processo de publicação