

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**LEVEDURAS EXTRAÍDAS DO MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO
Melipona mandacaia COM POTENCIAL FERMENTATIVO**

ANA CÁCIA FREIRE DOS SANTOS

**PETROLINA, PE
2023**

ANA CÁCIA FREIRE DOS SANTOS

LEVEDURAS EXTRAÍDAS DO MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO
***Melipona mandacaia* COM POTENCIAL FERMENTATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IF Sertão PE *Campus*
Petrolina Zona Rural, exigido para a obtenção
de título de Engenheiro Agrônomo.

Orientador: Professor MSc. Francisco Macedo de Amorim

PETROLINA, PE
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S237 Santos, Ana Cácia Freire dos.

Leveduras extraídas do mel de abelhas sem ferrão *Melipona mandacaia* com potencial fermentativo / Ana Cácia Freire dos Santos. - Petrolina, 2023.
34 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Agronomia) -Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano, Campus Petrolina Zona Rural, 2023.
Orientação: Prof. Msc. Francisco Macedo de Amorim.
Coorientação: Dr. Silver Jonas Alves Farfan.

1. Ciências Agrárias. 2. Abelha sem ferrão. 3. Mel. 4. Leveduras. 5. Fermentação.
I. Título.

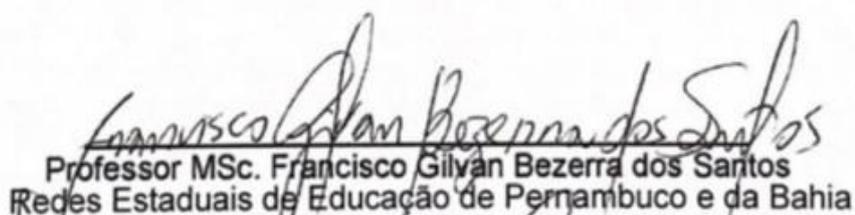
CDD 630

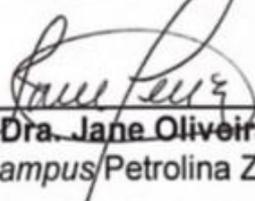
ANA CÁCIA FREIRE DOS SANTOS

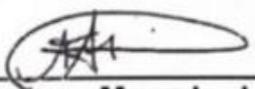
LEVEDURAS EXTRAÍDAS DO MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO
***Melipona mandacaia* COM POTENCIAL FERMENTATIVO**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao
IFSertãoPE Campus Petrolina Zona Rural, exigido
para a obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovada em: 25 de outubro de 2023.


Professor MSc. Francisco Gilvan Bezerra dos Santos
Redes Estaduais de Educação de Pernambuco e da Bahia


Professora Dra. Jane Oliveira Perez
IFSertãoPE, Campus Petrolina Zona Rural


Professor MSc. Francisco Macedo de Amorim (Orientador)
IFSertãoPE, Campus Petrolina Zona Rural

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Acássia Freire e José dos Santos (*in memoria*) que ampararam meus primeiros passos e os seguintes com todo o apoio possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A todos meus familiares, em especial aos meus pais, esposo e irmãos, por estarem sempre ao meu lado apoiando e mostrando-me o melhor caminho a ser seguido. Que apesar de todas as dificuldades, confiaram e dedicaram grande parte de suas vidas em função de meu crescimento intelectual e sucesso pessoal.

Ao IFSertãoPE *Campus* Petrolina Zona Rural pela oportunidade da realização do curso e pelo apoio técnico.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco pela parceria na realização da pesquisa e pelo apoio logístico

Desejo expressar minha homenagem aos professores MSc. Francisco Amorim e o Dr. Silver Farlan, que contribuíram de forma direta ao desenvolvimento deste trabalho, orientação e apoio recebido.

Aos demais professores do curso, pelos ensinamentos, conhecimentos, ideias, sugestões e críticas construtivas.

Aos amigos e colegas do curso, pelo convívio, ajuda, troca de experiências e descontração.

E aos que nesse momento passaram pelo lapso de memória, saibam que expressei minha gratidão por estarem direta e indiretamente ligados ao desenvolvimento e êxito deste trabalho.

EPÍGRAFE

Levedura, um ser tão pequeno,
insignificante apenas no tamanho.

RESUMO

Atualmente, há uma grande busca por novos microrganismos que possam sintetizar, melhorar a qualidade e/ou reduzir custos de diversos processos e produtos. Direcionar as buscas em possíveis fontes desses microrganismos pode reduzir tempo e custos com pesquisas. O mel de abelhas sem ferrão é uma excelente fonte de carboidratos para processos fermentativos. Já foram descritas algumas espécies de leveduras osmofílicas que, além de viver nesse substrato, participam e contribuem com o processo de maturação. Diante dessa possível fonte, o presente trabalho teve como objetivo a prospecção de leveduras presentes no mel de abelha *Melipona mandacaia*, para contribuir com a compreensão da microbiota presente e selecionar microrganismos com potencial fermentativo. Como resultados, foram obtidas 101 colônias de leveduras, das quais 25 foram selecionadas e isoladas para a análise morfológica e ensaios fermentativos. A análise microscópica mostrou que não havia presença de hifas ou pseudo-hifas dentre os isolados e as formas presentes foram dos tipos circulares e ovaladas. Dessas 25 leveduras, 24 foram capazes de fermentar a glicose, 21 a frutose e 9 a sacarose. Não foram observadas fermentações dos açúcares lactose e maltose, entretanto, todas elas fermentaram o meio com mel. Apenas 4 leveduras foram capazes de fermentar 3 açúcares (glicose, frutose e sacarose) e a levedura sob o código V1-1A foi a que apresentou o melhor perfil fermentativo, sendo uma provável candidata para fermentação de bebida do tipo hidromel. Futuros estudos com esses isolados poderão contribuir ainda mais com a identificação da microbiota presente nas amostras de méis, suas associações com as abelhas e trazer benefícios para a produção de alimentos e bebidas fermentadas.

Palavras-chave: Abelha sem ferrão; Mandaçaia; *Melipona mandacaia*; Mel; Leveduras; Fermentação.

ABSTRACT

Currently, there is a great search for new microorganisms that can synthesize, improve the quality and/or reduce costs of various processes and products. Targeting searches at possible sources of these microorganisms can reduce research time and costs. Stingless bee honey is an excellent source of carbohydrates for fermentative processes. Some species of osmophilic yeast have already been described which, in addition to living in this substrate, participate and contribute to the maturation process. Given this possible source, the present work aimed to prospect for yeasts present in *Melipona mandacaia* bee honey, to contribute to the understanding of the microbiota present and select microorganisms with fermentative potential. As results, 101 yeast colonies were obtained, of which 25 were selected and isolated for morphological analysis and fermentative assays. Microscopic analysis showed that there was no presence of hyphae or pseudohyphae among the isolates and the forms present were circular and oval types. Of these 25 yeasts, 24 were capable of fermenting glucose, 21 fructose and 9 sucrose. No fermentations of the sugars lactose and maltose were observed, however, they all fermented the medium with honey. Only 4 yeasts were capable of fermenting 3 sugars (glucose, fructose and sucrose) and the yeast under code V1-1A was the one with the best fermentative profile, being a likely candidate for fermenting a mead-type drink. Future studies with these isolates could further contribute to the identification of the microbiota present in honey samples, their associations with bees and bring benefits to the production of fermented foods and beverages.

Key words: Stingless bee; Mandaçaia, *Melipona mandacaia*; Honey; Yeasts; Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da região (Município de Petrolina – PE) indicando os pontos de coleta	20
Figura 2 - Imagem representativa da escala de leitura no tubo de Durhan	21
Figura 3 - Placa mostrando o crescimento dos isolados em meio BDA com tetraciclina.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Visualização dos isolados conforme o tipo de amostra, codificação, morfologia celular e local de coleta	24
Tabela 2 - Demonstrativo da fermentação das leveduras frente aos açúcares frutose, glicose, sacarose, lactose e maltose	25
Tabela 3 - Perfil fermentativo com respectivas numerações, obtidas pela análise das leituras dos tubos de Durhan invertido	26

SÚMARIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 12
2	OBJETIVOS 14
2.1	OBJETIVO GERAL 14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14
3	REFERENCIAL TEÓRICO 15
3.1	PRODUÇÃO DE MEL NO BRASIL 15
3.2	ABELHAS SEM FERRÃO 16
3.3	LEVEDURAS NO MEL 17
4	MATERIAL E MÉTODOS 19
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES 22
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS 28
	REFERÊNCIAS 29

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país tropical que possui um vasto potencial para a produção apícola e está entre os principais exportadores de méis considerados de alta qualidade. Em 2019, no ranking de produção mundial, ocupou a décima primeira posição e em 2022 atingiu a marca de produção de 60.966.305 kg do produto (IBGE, 2021; Vidal; 2022).

O mel é uma substância que possui um alto valor nutricional e é produzida principalmente a partir do néctar das flores, por abelhas melíferas, principalmente pelas pertencentes ao gênero *Apis* (Bera; Almeida-Muradian, 2007). As abelhas sem ferrão, membros da família Apidae e da tribo Meliponini, embora produzam mel em menor quantidade, quando comparado com as abelhas com ferrão, se destacam por ser um produto diferenciado do mel de *Apis* e muito associado a propriedades medicinais (Carvalho *et al.*, 2005). E nessa tarefa de produzir o mel, as meliponídeas realizam também o trabalho da polinização de diversas espécies de plantas nativas e cultiváveis contribuindo com a produtividade e rendimento das plantações (Klein *et al.*, 2007).

O mel produzido pelas meliponídeas possui uma certa variabilidade na sua composição que está associada a diversos fatores, como clima, disponibilidade de água, florada predominante, região, espécie de abelha, entre outros. De uma forma geral ele é composto por açúcares como frutose e glicose, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonóides, antioxidantes, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas, minerais, cinzas, água e pequenas concentrações de fungos, algas e leveduras (Gois, 2013).

É importante salientar que as leveduras, além de estarem presentes no ambiente (local de coleta, pousio, ninhos, corpo e trato gastrointestinal das abelhas), atuam no processo maturativo do mel através de fermentações, ou seja, influenciam na qualidade do produto e suas características sensoriais, químicas e físicas (Fernandes *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2021; Souza, 2022).

Apesar da importância desse processo de maturação, ainda existe pouca informação registrada acerca do envolvimento das leveduras na fermentação do néctar, mel e principalmente do potencial biotecnológico que as mesmas possuem (Daniel *et al.*, 2013).

Atualmente, existe uma crescente procura por novos microrganismos com potencial biotecnológico, principalmente aqueles envolvidos em processos fermentativos que possam melhorar a qualidade dos produtos fermentados, trazer características novas, reduzir custos e acelerar o tempo de produção (Silva *et al.*, 2021; Ernandes; Garcia-Cruz, 2009). Seguindo nessa linha, ambientes que favorecem a presença dessas leveduras podem ser uma fonte assertiva para encontrá-las. Uma das principais características da composição físico-química do mel da abelha mandaçaia (*Melipona mandacaia*), que é uma das várias espécies de abelha sem ferrão, é o seu maior teor de umidade comparado aos outros tipos de mel, o que proporciona o crescimento de leveduras que estão presentes em sua composição original (Bijlsma *et al.*, 2006; Camargo, 2017).

Dessa forma, pesquisas de prospecção, cuja etapa inicial de seleção pode ser feita através da exploração da biodiversidade, como o isolamento das leveduras presentes no mel de abelhas nativas sem ferrão, podem fornecer base para a pesquisa de organismos, processos ou produtos de interesse biotecnológico. Além de contribuir para o entendimento sobre a microbiota, associação desta com as abelhas e abrir possibilidades para futuras pesquisas nesse campo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Prospectar leveduras do mel da abelha sem ferrão mandaçaia (*Melipona mandacaia*) com potencial fermentativo;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o isolamento de leveduras presentes no mel;
- Caracterizar morfológicamente as leveduras isoladas;
- Quantificar as leveduras presentes nas amostras de mel;
- Testar o potencial dos isolados de leveduras para fermentação de açúcares como: glicose, frutose, sacarose, lactose e maltose;
- Encontrar isolados com capacidade para fermentar bebida do tipo hidromel.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

O mel é um produto alimentício doce e viscoso produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar e do pólen das plantas, sendo este último pouco presente (Souza *et al.*, 2023). É considerado um dos alimentos mais antigos e amplamente consumidos pela humanidade, sendo apreciado tanto pelo seu sabor doce quanto pelas suas propriedades nutricionais e medicinais (Crane, 2004, *apud* Souza, 2022). O mel é essencialmente uma solução aquosa concentrada composta principalmente por frutose e glicose, e em menores quantidade por açúcares mais complexos, como a maltose, a sacarose, bem como alguns oligo e polissacarídeos. Possui ainda pequenas quantidades de outros constituintes, como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, ácidos fenólicos, enzimas e outros fitoquímicos. (Escuredo *et al.*, 2014; Ramanauskiene *et al.*, 2012; Rao *et al.*, 2016).

Cada mel é considerado único, pois reflete em sua composição os compostos bioativos derivados das próprias abelhas e principalmente das plantas por elas visitadas. Por esse motivo, quanto à sua origem, o mel pode ser classificado em floral (obtido dos néctares das flores) ou mel melato (formado principalmente a partir de secreções de partes vivas das plantas), sendo o primeiro considerado mais complexo quanto a sua composição (Brasil, 2000; Mendes *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2016).

3.1. PRODUÇÃO DE MEL NO BRASIL

A produção de mel no Brasil vem se consolidando como uma alternativa para geração de renda, que se destaca pela sua facilidade de criação e por ser uma atividade de fácil manutenção e de baixo custo (Rêgo *et al.*, 2017). Além disso, nos últimos anos, tem-se observado uma crescente procura por este produto, tanto no mercado nacional, quanto no internacional, devido a sua reconhecida qualidade e propriedades medicinais (Carvalho *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2016).

Em 2019, Vidal (2022) afirmou que o Brasil foi o décimo maior produtor mundial, com a produção de quase 46 mil toneladas. Sendo que a região Nordeste,

no último censo agropecuário, passou a responder pelo maior volume de mel produzido (23.578.493 kg), seguido da região Sul (22.406.113 kg), que antes disso era a maior produtora (IBGE, 2022). Os méis produzidos no Nordeste do Brasil têm uma produtividade maior e uma grande aceitação no mercado, pelo diferencial de serem provenientes de vegetação nativa (Rêgo *et al.*, 2017; Vidal, 2017).

A vasta extensão territorial brasileira, bem como os diversos biomas presentes, favorece a presença de um grande número de espécies florais que são visitadas pelas abelhas. Essa diversidade é refletida em méis com diferentes composições, características sensoriais únicas, com grande valor agregado e que podem ser produzidos tanto por abelhas com ferrão, como pelas nativas sem ferrão (Durazzo *et al.*, 2021; Leite *et al.*, 2000).

De acordo com Silva (2008), a exploração econômica do mel ocorre principalmente nas abelhas com ferrão do gênero *Apis*. Contudo, apesar da menor produção, os méis das abelhas sem ferrão mostram-se mais diversificados em relação aos sabores, cores, aromas e tem maior valor na medicina popular devido a uma série de propriedades terapêuticas que possui, como atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, antibiótica, depurativa, imunostimulante e cicatrizante (Abadio Finco; Estevinho *et al.*, 2012; Moura; Silva, 2010; Roubik, 2006).

3.2. ABELHAS SEM FERRÃO

A fauna brasileira de abelhas sem ferrão (espécies incapazes de ferrear por terem o acúleo atrofiado) compreende mais de 244 espécies da tribo Meliponini distribuídas em 29 gêneros, sendo 50% dessas espécies endêmicas da Mata Atlântica (Pedro, 2014). Esses números, quando somados aos registros feitos nos demais países da América Latina, Austrália, África e partes tropicais da Ásia, já ultrapassa 500 espécies e 61 gêneros (Silva, 2022; Souza; Menezes; Flach, 2021).

As abelhas da subfamília Meliponinae (Hymenoptera, Apidae) estão agrupadas taxonomicamente na tribo “Meliponini”, no gênero *Melipona*. Essas abelhas têm uma extrema importância econômica e ecológica para a região semiárida por alimentar-se de produtos obtidos das flores e carregar os grãos de

pólen entre as flores, fazendo assim a sua polinização (Camargo, 2017). Essas abelhas estocam pólen (fonte de proteína, lipídeos e vitaminas) e néctar (principal fonte de carboidratos) como uma forma de suprir as necessidades da colônia durante os períodos de escassez de recursos (Maia Silva *et al.*, 2015; Silva, 2022).

Os alimentos coletados das flores são transportados em estruturas próprias, como a corbícula (localizado na tíbia traseira), para o caso do pólen, e a vesícula melífera, ou papo de mel, onde o néctar recebe enzimas provenientes de glândulas do abdômen e das glândulas cefálicas e começa a ser processado (Silva, 2022; Villas Bôas, 2018).

As abelhas sem ferrão constroem potes de cerume onde depositam seu alimento e algumas secreções ricas em enzimas, juntamente com alguns microrganismos. Apesar do formato dos potes variar de acordo com as diferentes espécies, a maioria deles apresentam formato elipsoides que, quando cheios, são vedados, tornando o ambiente propício a fermentações (Silva, 2022; Villas Bôas, 2018).

Cavalcante da Silva (2018) relata que uma das principais diferenças do mel das abelhas sem ferrão, em relação ao das abelhas com ferrão, é o seu maior teor de umidade, que conseqüentemente eleva sua atividade de água, e o deixa mais suscetível ao crescimento microbiano, principalmente de leveduras osmofílicas. De certa forma, pode-se afirmar que o mel é um meio que favorece a presença dessas leveduras e pode ser uma fonte assertiva para a bioprospecção das mesmas e fazer proveito dos seus possíveis produtos e processos (ex. fermentativos e oxidativos) (Camargo, 2017; Rao *et al.*, 2016).

3.3. LEVEDURAS NO MEL

As leveduras podem estar presentes nos mais variados tipos de ambientes e exercer sobre eles muita influência, devido ao seu metabolismo. A exemplo disso, as leveduras associadas ao mel podem ser encontradas nas plantas, flores, néctar, pólen, ou nas suas colônias. Essas espécies podem interagir com as abelhas por simbiose, contribuindo com a nutrição, produção de biomoléculas, inibindo o

crescimento de outros patógenos (através da produção de compostos antimicrobianos), fazendo a transformação e/ou quebra de moléculas, entre outros benefícios que contribuem para a fermentação e maturação do mel. Muitas dessas espécies fermentam açúcares em diversos subprodutos (como álcoois e ácidos) e por isso despertam interesses diversos devido ao seu potencial biotecnológico (Barry *et al.*, 2018; Gomes, 2010; Paula *et al.*, 2021; Silva, 2022; Rao *et al.*, 2016).

Segundo Mendes *et al.* (2009), a microbiota do mel pode ser inerente ao mel (bolores e leveduras) ou de contaminação secundária (exemplo, coliformes), diretamente relacionados à extração e ao beneficiamento. O primeiro grupo, geralmente contribuem ou não interferem na qualidade do mel e, devido ao crescente interesse na produção de bebidas fermentadas (hidromel dentre outras), tem sido alvo de diversas pesquisas de bioprospecção. Tais estudos visam a obtenção de características únicas e agradáveis de sabor e aroma, além de obter linhagens mais adaptadas ao clima, fermentando em temperatura ambiente (Barry *et al.*, 2018).

As principais leveduras encontradas no mel são pertencentes ao gênero *Saccharomyces*, mas outros gêneros, como *Debaryomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torula*, *Zygosaccharomyces*, *Wickerhamomyces*, *Kloeckera*, *Starmerella*, *Lachancea*, entre outros que também já foram encontrados (Barbosa *et al.* 2016; Echeverrigaray *et al.*, 2021; Meireles, 2018; Rosa *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2023; Teixeira *et al.* 2003). Por se tratar de um alimento constituído de vários açúcares de fácil utilização, Silva *et al.* (2022) aponta que a pesquisa sobre a microbiota do mel é de grande importância e, ainda, pouco se sabe sobre a relação das leveduras com as abelhas.

Já foram elucidados, ainda que não totalmente, inúmeros benefícios que esses microrganismos podem trazer às abelhas, como secretar muitas enzimas proteolíticas, glicolíticas e lipolíticas, que irão converter, fermentar e/ou preservar o mel (Gilliam *et al.*, 1990) e por isso trabalhos voltados para essa temática são de grande valor.

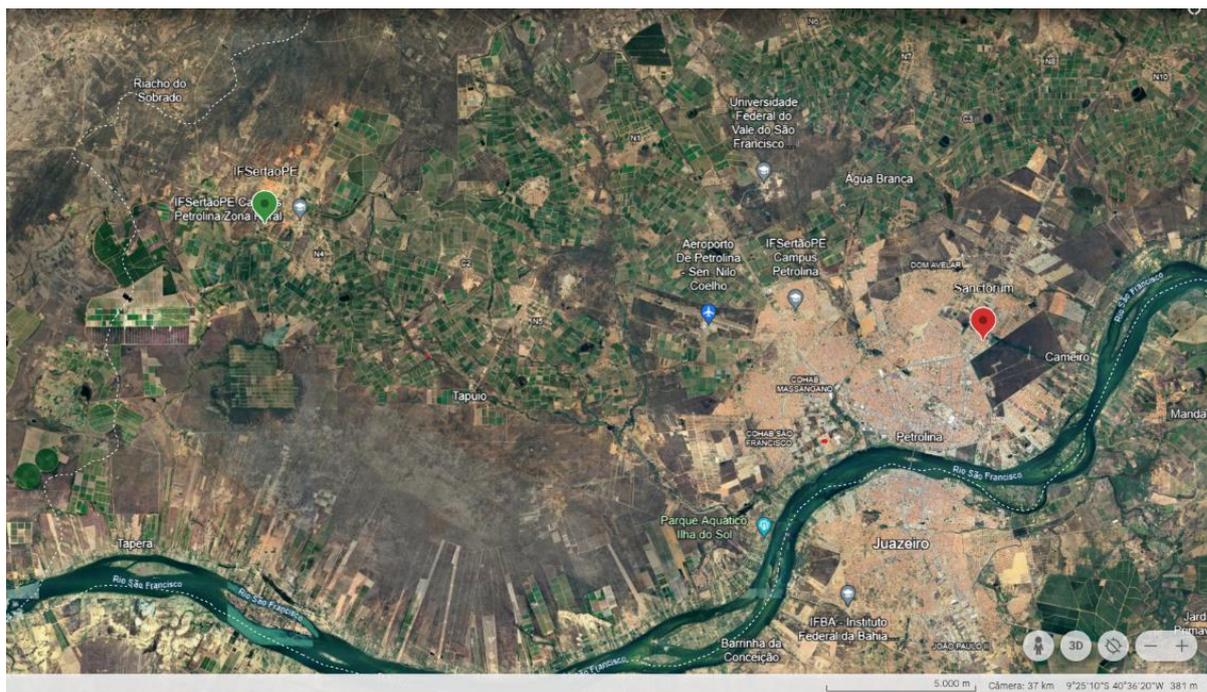
4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa analítica e descritiva, de abordagem quantitativa e de caráter experimental, que foi realizado através de coleta de amostras de méis de abelha sem ferrão, isolamento de leveduras e análise de fermentação dos isolados.

Para ter o acesso ao patrimônio genético, o projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen - Número do Cadastro: A776CC0).

A coleta de amostras foi feita em 2 meliponários no Município de Petrolina-PE (figura 1), sendo um localizado na zona urbana (Meliponário Sanctorum, localizado sob as coordenadas 9°22'17"S 40°28'59"O) e 1 na zona rural (Meliponário do IFSertãoPE, localizado sob as coordenadas 9°20'12"S 40°41'54"O). Esta etapa foi realizada nos dias 23 e 24 de outubro de 2022, período da primavera, no qual foram observados em média 54,9 mm chuva, e uma predominância de *Mimosa arenosa* (jurema), na composição da flora regional.

Figura 1 - Mapa da região (Município de Petrolina – PE) indicando os pontos de coleta. Marcador vermelho mostrando a localização do Meliponário Sanctorum, na região urbana, e o marcador verde mostrando a localização do Meliponário do IFSertãoPE.



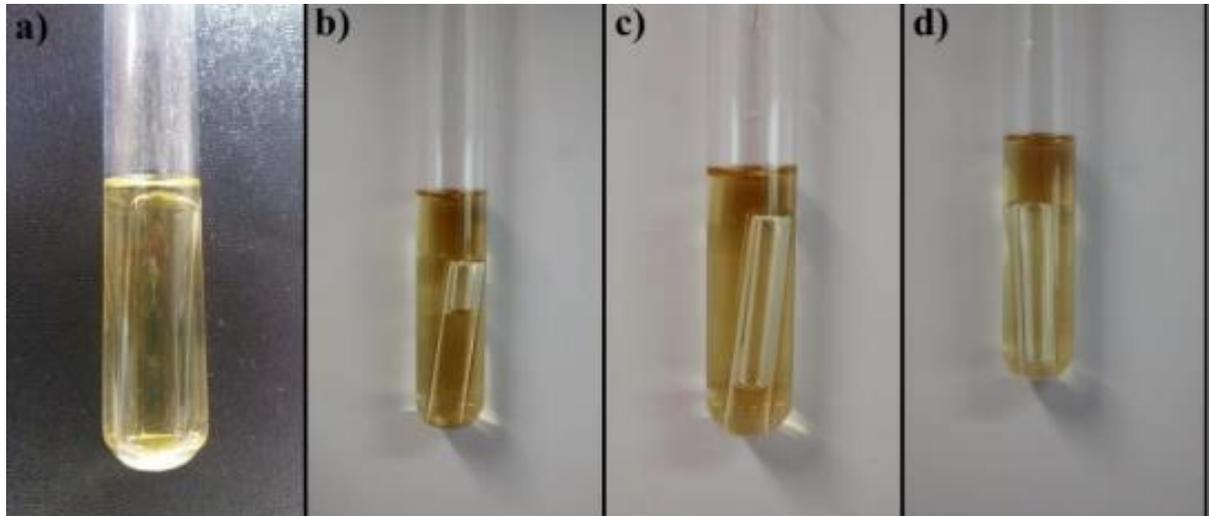
Fonte: Google Earth ©2023 Google.

A etapa laboratorial da pesquisa foi realizada nas instalações dos laboratórios de microbiologia e microscopia da Universidade Federal do Vale do São Francisco - *Campus* centro, Petrolina-PE.

Nos meliponários, as amostras foram coletadas através de sucção com seringas descartáveis. De cada uma das colmeias (caixa da abelha) foram coletadas duas amostras, uma de pote de mel ainda aberto (mel verde) e a outra de pote fechado (mel maduro). As amostras foram armazenadas em tubos de Eppendorf de 2 mL e mantidas em caixas com gelo até o processamento no laboratório. Seguindo a metodologia apresentada por Amorim (2014), no processamento das amostras, uma alíquota de 1 mL de mel foi colocada em uma suspensão com 9 mL de água peptonada acrescida de tetraciclina (10 mg/L). Foram realizadas diluições decimais, até 10^{-4} , e essas diluições foram semeadas em meio sólido (3,9% de BDA (p/v), e 10 mg/L de tetraciclina) e incubadas até seis dias a temperatura de 28°C. Essas placas foram utilizadas para a contagem de levedura (método de contagem em placas – unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL)) e para a obtenção dos isolados. As colônias isoladas com características macroscópicas e microscópicas de levedura foram semeadas por esgotamento em outro meio contendo YPD (2% de peptona (p/v), 1% de extrato de levedura (p/v) e 2% de dextrose (p/v)) e incubadas a 28°C durante seis dias (Amorim, 2014; Lopes, 2016).

Os isolados e uma levedura controle comercial (Mangrove Jacks - M05 – Mead yeast - para hidromel) foram inoculadas em tubos, com tubos de Durham invertidos, contendo 5 mL de meio teste (0,75% (p/v) de NaCl e 0,45% (p/v) de extrato de levedura) e 2% de cada açúcar a ser testado: glicose, frutose, lactose, maltose e sacarose. Os tubos ficaram incubados por 8 dias a 28°C e as observações realizadas nos dias 1, 3, 5 e 8. Considerou-se uma leitura negativa quando não houve acúmulo de CO₂ no tubo de Durham, +1 quando somente 1/3 do tubo de Durham estava preenchido pelo gás, +2 quando o gás preencheu 2/3 do tubo e +3 quando o tubo de Durham estava completamente cheio de gás, a figura 2 exemplifica esses resultados (Lopes, 2016). Para identificar os isolados com capacidade para fermentar bebida do tipo hidromel, a análise foi feita substituindo o açúcar por mel comercial de abelha *Apis*. A levedura comercial foi utilizada como controle positivo, tubos sem nenhuma inoculação foram utilizados como controle negativo e todo o experimento foi realizado em triplicata.

Figura 2 - Imagem representativa da escala de leitura no tubo de Durham. a) resultado negativo ou zero; b) resultado +1 (1/3 de preenchimento); c) resultado +2 (2/3 de preenchimento); d) +3 (tubo totalmente preenchido por CO₂).



Fonte: Lopes, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da metodologia utilizada, foram contabilizadas, no total, 101 colônias de leveduras, sendo 47 observadas da amostra de mel verde do ninho 1 (V1), 38 da amostra de mel maduro do ninho 1 (M1), 1 da amostra de mel verde do ninho 2 (V2), 10 da amostra de mel verde do ninho 3 (V3) e 5 da amostra de mel maduro do ninho 3 (M3). As placas da amostra de mel maduro do ninho 2 (M2) não apresentaram crescimento de nenhuma colônia de levedura.

Justificando a presença de maior número de colônias de leveduras nas amostras de méis verdes, cabe ressaltar que, no processo de maturação, o mel vai perdendo parte do seu teor de umidade e o ambiente se torna menos favorável ao desenvolvimento de microrganismos. Adicionalmente a este fato, o fechamento dos potes de méis cria um ambiente sem oxigênio, limitando a presença aos anaeróbios facultativos (Moraes *et al.*, 2013; Paula *et al.*, 2021; Vit, 2022).

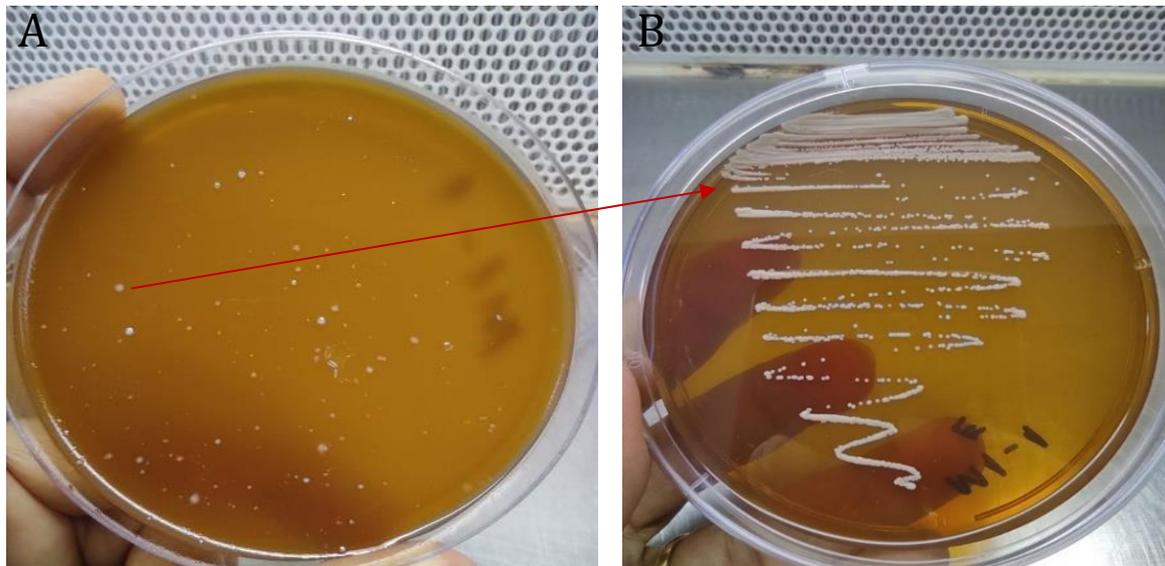
Segundo Camargo, *et al.* (2017), o elevado teor de açúcares, a baixa de atividade de água e o pH baixo não favorecem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no mel. Contudo, esse autor enfatiza que microrganismos osmofílicos podem se desenvolver e participar do processo de maturação dos méis. Tais afirmações sugerem que, as leveduras encontradas neste trabalho possivelmente são do tipo osmofílicas e que podem adicionar características próprias no processo de maturação desses méis (Pinheiro *et al.*, 2018).

Diferindo do mel de *Apis*, que possui valores de atividade de água inferiores a 0,6 (produto microbiologicamente estável), os méis das abelhas sem ferrão, das tribos Meliponini e Trigonini, mostram atividade de água variando de 0,67 a 0,75 (Dias *et al.*, 2015). Este fato poderia levar a uma maior presença de microrganismos nos méis das abelhas sem ferrão. Entretanto, a quantificação das leveduras presentes nas amostras (UFC/mL= Número de colônias na placa x fator de diluição/ volume do inóculo) trouxe os seguintes resultados: V1 com $3,2 \times 10^1$ UFC/mL, M1 com $2,7 \times 10^1$ UFC/mL, V2 com 1,0 UFC/mL, M2 com 0,0 UFC/mL, V3 com 6,0 UFC/mL, e M3 com 5,0 UFC/mL. Esses valores encontrados atendem aos critérios microbiológicos estabelecidos para mel de abelhas *Apis* (para o critério de aceitação, a contagem não deve ultrapassar $1,0 \times 10^2$ UFC/ml) (Brasil, 2000) e também para mel de abelhas sem

ferrão, onde são permitidos valores até a ordem de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL, segundo Camargo *et al.*, (2017).

A pouca quantidade de leveduras encontradas nas amostras possivelmente estão ligadas a espécie de abelha, as características climáticas e botânicas da região, época do ano entre outros fatores, uma vez que, outros autores com pesquisas semelhantes feitas em outras localidades e regiões, na maioria das vezes, reportam valores superiores em suas pesquisas (Rosa *et al.*, 2003; Souza, *et al.*, 2009; Monte *et al.*, 2013; Barbosa *et al.* 2016; Fernandes; Rosa; Conti Silva, 2018; Pinheiro *et al.*, 2018)

Figura 3 - Crescimento das colônias em meio BDA com tetraciclina (A). isolamento de levedura em meio YPD a partir da seleção de colônias isoladas (B).



Fonte: Própria autora, 2023.

Para as análises de fermentação, um total de 25 isolados foram selecionados com base nas diferenças morfológicas das colônias crescidas (figura 3). Quanto a morfologia celular das amostras, foram observadas apenas variações entre células circulares e ovaladas e em nenhuma das amostras foram observadas hifas ou pseudohifas. Essa variação da morfologia celular, leva a acreditar que existem no mínimo duas espécies diferentes de leveduras, porém essas formas não são parâmetros para identificação de espécies (Tortora *et al.*, 2012). A tabela 1 mostra o resultado da análise morfológica dos isolados.

Tabela 1 - Visualização dos isolados conforme o tipo de amostra, codificação, morfologia celular e local de coleta.

AMOSTRA	CODIFICAÇÃO dos isolados	MORFOLOGIA CELULAR	LOCAL DA COLETA
M1	M1-1A-Bege	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1A-Branca	Circular	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1B	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1C-Bege	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1C-Branca	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1D	Circular	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1E	Circular	Meliponário Sanctorum
M1	M1-1F	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-2A	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M1	M1-2B	Ovóide	Meliponário Sanctorum
V1	V1-1A	Ovóide	Meliponário Sanctorum
V1	V1-1B	Ovóide	Meliponário Sanctorum
V1	V1-1C	Circular	Meliponário Sanctorum
V1	V1-2A-Bege	Ovóide	Meliponário Sanctorum
V1	V1-2A-Branca	Circular	Meliponário Sanctorum
V1	V1-2B	Circular	Meliponário Sanctorum
V1	V1-2C	Circular	Meliponário Sanctorum
V1	V1-2D	Circular	Meliponário Sanctorum
V2	V2-1A	Ovóide	Meliponário Sanctorum
M3	M3-1A	Ovóide	Meliponário do IFSertãoPE
M3	M3-1B	Ovóide	Meliponário do IFSertãoPE
M3	M3-1C	Ovóide	Meliponário do IFSertãoPE
V3	V3-1A	Circular	Meliponário do IFSertãoPE
V3	V3-2A	Ovóide	Meliponário do IFSertãoPE
V3	V3-2B	Ovóide	Meliponário do IFSertãoPE

Fonte: Própria autora, 2023.

As leveduras, como qualquer outra forma de vida, necessitam de fatores físicos, químicos e nutricionais que são imprescindíveis para o seu crescimento e reprodução, como temperatura, pH, umidade, água, carbono, nitrogênio, oxigênio e minerais, sendo os açúcares a principal fonte fornecedora de carbono para estas (Tortora *et al.*, 2012). Levando esse conhecimento em consideração, os isolados foram testados quanto a sua capacidade de crescimento em diferentes açúcares, e por tanto, foram avaliados quanto a sua capacidade de fermentação e também de crescimento, trazendo os resultados gerais observados na tabela 2. Dos 25 isolados, 24 fermentaram glicose, 21 a frutose e 9 a sacarose. Como observado nos testes de fermentação e corroborando com os achados da literatura, as leveduras possuem preferência pelos açúcares mais simples, e o processo fermentativo, ocorre na ordem – glicose (monossacarídeo), frutose (monossacarídeo), sacarose (dissacarídeo), maltose (dissacarídeo) (Lopes, 2010; Lopes, 2016; Palmer, 2006; White e Zainasheff, 2010).

Tabela 2 - Demonstrativo da fermentação das leveduras frente aos açúcares frutose, glicose, sacarose, lactose e maltose.

Açúcar	Fermentação
Glicose	Elevada – 24 isolados
Frutose	Elevada – 21 isolados
Sacarose	Baixa – 9 isolados
Lactose	Não observada
Maltose	Não observada

Fonte: Própria autora, 2023.

Apenas um dos 25 isolados (M3-1B) não se mostrou capaz de fermentar a glicose. Já com a frutose o número de não fermentadores subiu para 4 e na sacarose foram 16. Nenhum dos isolados foi capaz de fermentar maltose ou lactose. Essa fermentação preferencial de glicose e frutose deve-se ao fato de que a maioria das espécies de levedura podem utilizar um ou ambos como fontes de carbono para o metabolismo celular (Lopes, 2016; Barry *et al.*, 2018). A glicose e a frutose são prontamente fermentadas pela levedura à medida que são transportadas para dentro da célula por difusão facilitada. Já os demais açúcares necessitam de transportadores de membrana ou enzimas que atuem no ambiente extracelular, quebrando estes açúcares maiores em outros mais simples, como glicose e frutose (Meneses e Jiranek, 2002; Magalhães *et al.*, 2016). Além disso, a glicose reprime a síntese de transportadores de maltose e maltotriose e inativa os transportadores pré-existent (Lucero *et al.*, 1993; Dietvorst *et al.*, 2005; Badotti, 2005). Portanto, pode-se inferir que o número elevado de isolados que não fermentaram sacarose e a ausência de fermentação na maltose e lactose podem estar ligados a falta de mecanismos genéticos para a utilização desses açúcares, uma vez que o ambiente que eles vivem, geralmente, não os possui.

Souza e colaboradores (2006) mostraram que o conteúdo de açúcares totais, no mel de abelhas sem ferrão, varia de 85 a 95% em relação aos demais compostos, sendo a glicose cerca de 32% desse percentual e a frutose 39%. Sacarose não é um açúcar comumente encontrado no mel, mas, dependendo da espécie e do tipo de alimentação da abelha, pode aparecer em baixas concentrações. Além disso, sofre ação enzimática durante seu transporte e armazenamento, o que reduz ainda mais suas concentrações. O mel não adulterado não contém maltose, e, assim como a sacarose, serve como parâmetro para avaliar a pureza do mel, podendo caracterizar adulteração, tanto na alimentação das abelhas quanto na adição direta destes no mel (Azeredo *et al.*, 1999; Bera, 2004; Fujita, 2012; Ruiz-Matute *et al.*, 2010).

O teste de fermentação mostrou, também, que todas as leveduras isoladas neste trabalho foram capazes de fermentar o mel. Algumas destas apresentaram maior produção de CO₂ do que a própria levedura comercial utilizada para fermentação de hidromel (destacado em negrito na tabela 3).

Tabela 3. Perfil fermentativo do mel com respectivas numerações, obtidas pela análise das leituras dos tubos de Duhran invertido, conforme descrito na figura 1. CT- é o controle negativo, CT+M05 é o controle positivo (levedura comercial).

Amostra	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
M1-1A-Bege	1	1	3
M1-1A-Branca	1	1	3
M1-1B	1	1	3
M1-1C-Bege	3	3	3
M1-1C-Branca	3	3	3
M1-1D	1	1	1
M1-1E	3	3	3
M1-1F	3	3	2
M1-2A	3	3	3
M1-2B	3	3	3
V1-1A	3	3	1
V1-1B	1	2	3
V1-1C	3	3	1
V1-2A-Bege	3	3	2
V1-2A-Branca	1	3	3
V1-2B	3	3	3
V1-2C	1	1	3
V1-2D	1	1	2
V2-1A	1	3	3
M3-1A	1	3	3
M3-1B	2	3	3
M3-1C	1	1	1
V3-1A	1	2	3
V3-2A	1	3	3
V3-2B	1	3	3
CT+M05	2	2	3
CT-	0	0	0

Fonte: Própria autora, 2023.

O fato de todas as leveduras darem resultados positivos já era esperado, pois todos os isolados foram capazes de fermentar ao menos um dos açúcares simples presentes no mel (glicose e frutose). Citando aqui, temos os isolados M1-1C-Bege, M1-1D, M1-1E e V1-2A-Bege que não fermentaram frutose, mas foram positivos para glicose, e o M3-1B (mencionado anteriormente) que não fermentou glicose, mas foi positivo para frutose. Methener e colaboradores (2019), reportaram que a utilização de açúcares pelas leveduras é variável e muitas vezes são relatadas divergências entre suas utilizações. A exemplo disso a cepa *Schizosaccharomyces pombe* S9 deles não fermentou a glicose nem a frutose, à semelhança da estirpe *Saccharomycopsis fibuligera* SF3, mas na literatura já havia relatos que *S. pombe* pode metabolizar glicose (Kurtzman, 2011, *apud* Methener *et al.*, 2019) e *S. fibuligera* utiliza frutose (Lee *et al.*, 2018, *apud* Methener *et al.*, 2019)

Apenas quatro isolados foram capazes de fermentar frutose, glicose e sacarose, V1-1A, V1-2B, V1-2C e V3-2B. Desses, o V1-1A, oriundo do mel verde, foi o que apresentou o perfil fermentativo mais semelhante ao da levedura controle (levedura para hidromel M05 da empresa Mangrove Jack's) e, portanto, é a levedura isolada mais promissora para futuras análises de produção de hidromel, embora todas as demais também possam ser testadas quanto ao seu potencial.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mel das abelhas nativas sem ferrão, da espécie *Melipona mandacaia*, mostrou - se uma fonte para a pesquisa de leveduras, visto que foram observadas 101 colônias de leveduras, das quais 25 foram selecionadas para as análises.

A quantificação de leveduras presentes nas seis amostras de méis encontrava-se dentro dos valores microbiológicos aceitáveis.

As análises microscópicas das leveduras mostraram apenas a presença de formas ovaladas e circulares e sem a presença de hifas ou pseudo-hifas.

Nos testes de fermentações, 24 leveduras foram capazes de fermentar a glicose, 21 a frutose e nove a sacarose.

Não foram observadas fermentações dos açúcares lactose e maltose, entretanto, todas elas fermentaram o meio com mel, mostrando-se passíveis de fermentar hidromel.

Quatro leveduras foram capazes de fermentar três açúcares (glicose, frutose e sacarose) e a levedura V1-1A foi a que apresentou o melhor perfil fermentativo, sendo uma provável candidata para fermentação de bebida do tipo hidromel.

Futuros estudos com esses isolados poderão contribuir ainda mais com a identificação da microbiota presente nas amostras de méis, adaptada ao clima da região do Vale do São Francisco, suas associações com as abelhas e trazer benefícios para a produção de alimentos e bebidas fermentadas.

Nesse sentido, maiores pesquisas desses isolados que podem trazer novas descobertas biotecnológicas, como a identificação de nova cepa de levedura com potencial de inovação devido a suas características únicas, e, assim, promover a produção e/ou melhoria de alimentos e bebidas feitas artesanalmente.

REFERÊNCIAS

ABADIO FINCO, F. D. B.; MOURA, L. L.; SILVA, I. G... Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 706-712, 2010.

AMORIM, S. S. **Isolamento e Caracterização de Leveduras com Potencial para a Biorremocão do Manganês**. 2014, 119 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/5703/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Isolamento%20Caracteriza%C3%A7%C3%A3oLeveduras.pdf. Acesso em: 4 Jun. 2023.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. C.; DAMASCE-NO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis - RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 3-7, 1999.

BARBOSA, R. N. *et al.* Propection on Yeasts from Stingless Bees Honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga). **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, 2016.

BARBOSA, R. N. *et al.* New *Penicillium* and *Talaromyces* species from honey, pollen and nests of stingless bees. **Antonie van Leeuwenhoek**, 111:1883-1912, 2018.

BARRY, J. P., *et al.* Two novel strains of *Torulaspora delbrueckii* isolated from the honey bee microbiome and their use in honey fermentation. **Fermentation**, v.4, a. 22, 2018.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciências Tecnologia Alimentos**. Campinas, v. 27, n 1, 2007.

BIJLSMA, L. *et al.* Water content of stingless bee honeys (*Apidae, Meliponini*) interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**. v. 37. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/copy_of_suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/IN11de2000.pdf. Acesso em: 23 de marco de 2023.

CAMARGO, R. C. R. *et al.* Mel de Abelhas Sem Ferrão: Proposta de Regulamentação. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v. 20, 2017.

CARVALHO, C. A. L. *et al.* Mel de abelha sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia. **SEAGRI-BA**. 2005. Disponível em: https://www2.ufrb.edu.br/insecta/images/publicacoes/meliponicultura/Serie_Meliponica_cultura_n4.pdf. Acesso em: 4 Jun. 2023.

CAVALCANTE da SILVA, S. M. P., *et al.* Production and characterization of mead from the honey of *Melipona scutellaris* stingless bees. **Journal of the Institute of Brewing**, n. 124, V.2, p. 2018.

DANIEL, H. M.; *et al.* *Starmerella neotropicalis* f. a., sp. nov., a yeast species found in bees and pollen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63, 2013.

DIAS, M. P. S. *et al.* Avaliação de parâmetros físico-químicos de mel de abelhas sem ferrão. *In: Simpósio Americano de Ciências de Alimentos*, 11., 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139103/1/2015RA-031.pdf>. Acesso em: 28 Nov. 2023.

DIETVORST, J.; LONDESBOROUGH, J.; STEENSMA, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTT1 encodes a maltotriose transporter. **Yeast**, v. 22, n. 10, p. 775-788, 2005.

DURAZZO, A. *et al.* Bee products: a representation of biodiversity, sustainability, and health. **Life**, n. 11. V. 9. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/9/970>. Acesso em: 16 Mai. 2023.

ECHEVERRIGARAY, S., *et al.* Yeast biodiversity in honey produced by stingless bees raised in the highlands of southern Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 347. 2021.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: um microorganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 30, n. 2. 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/29730c17-dfe7-43e4-934f-24c2933f3e6d/content>. Acesso em: 27 Mai. 2023.

ESCUREDO, O. *et al.* Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, p. 84–90, 2014.

ESTEVINHO, L. M. *et al.* Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): Chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 258–264, 2012.

FERNANDES, R. T.; ROSA, I. G.; CONTI-SILVA, A. C. Microbiological and physical-chemical characteristics of honeys from the bee *Melipona fasciculata* produced in two regions of Brazil. **Ciencia Rural** v. 48, 2018.

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

GOIS, G. C.; LIMA, C. A. B.; SILVA, L. T.; RODRIGUES, A. E. Composição do mel de *Apis Mellifera*: requisitos de qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.2, p.137-147, 2013. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/acta/article/download/3009/5219>. Acesso em: 27 Mai. 2023.

GOMES, T. **Produção de hidromel: efeito das condições de fermentação**. 2010. Tese de Doutorado. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. 2010. Disponível em: https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/5900/1/Gomes_Teresa.pdf. Acesso em: 4 Jun. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2022**. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. Acesso em: 23 agosto de 2022.

KLEIN, A. M. *et al.* Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. **Proceedings of the royal society B: biological sciences**, v. 274. 2007.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts**: a taxonomic study. Elsevier, 2011.

LEE, S. M., *et al.* Bioformation of volatile and nonvolatile metabolites by *Saccharomyces fibuliger* KJJ81 cultivated under different conditions—carbon sources and cultivation times. **Molecules**, v. 23, n.11, 2018.

LEITE, J. M. C. *et al.* Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food chemistry**, v. 70, n.1, p. 93-98, 2000.

LOPES, T. **Isolamento e identificação de leveduras selvagens de *citrus reticulata* com potencial para a fermentação de cervejas**. 2016. 60 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/170115/001027157.pdf?sequence=1>. Acesso em: 4 Jun. 2023.

LUCERO, P.; HERWEIJER, M.; LAGUNAS, R. Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1-2, p. 165-168, 1993.

MAGALHAES, F. *et al.* Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 5, p. fow053, 2016.

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

MEIRELES, S. F. *et al.* **Leveduras associadas ao ninho das abelhas sem ferrão *Melipona interrupta* e *Cephalotrigona femorata* (Apidae: Meliponini): identificação e aspectos biotecnológicos**. 2018, 80 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do Amazonas, Manaus. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6771>. Acesso em: 2 Jun. 2023.

MENDES, C. G. *et al.* As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, 2009. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/caatinga/article/view/789>. Acesso em: 2 Jun. 2023.

MENESES, F. J.; JIRANEK, 89V. Expression patterns of genes and enzymes involved in sugar catabolism in industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains displaying novel fermentation characteristics. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 3, p. 322-335, 2002.

METHNER, Y. *et al.* Screening for the brewing ability of different non-*Saccharomyces* yeasts. **Fermentation**, v. 5, n. 4, 2019.

MONTE, A.M. *et al.* Quality of honey from stingless bees native of Piauí, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.1, p.48-54, 2013.

MORAIS, P.B., CALAÇA, P.S.S.T., ROSA, C.A. **Microorganisms Associated with Stingless Bees**. In: VIT, P., PEDRO, S., ROUBIK, D. (eds) Pot-Honey. Springer, New York, NY. 2013.

NUNES, S. P.; HEINDRICKSON, M. A cadeia produtiva do mel no Brasil: análise a partir do sudoeste Paranaense. **Brazilian Journal of Development**, n. 5, v 9, p. 16950-16967, 2019.

OLIVEIRA, K. A. M.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. V. Caracterização microbiológica, físico-química e microscópica de mel de abelhas canudo (*scaptotrigona depilis*) e jataí (*tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n. 3, 2013.

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

PEDRO, S. R. D. M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: *Apidae*). **Sociobiology**, v. 61, n. 4, p. 348–354, 2014.

PINHEIRO, C. G. M. E., *et al.* Microbiological quality of honey from stingless bee, jandaíra (*Melipona subnitida*), from the semiarid region of Brazil. **Ciência Rural**, v. 48, 2018.

RAO, P. V. *et al.* Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: A comparative review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 5, 2016.

RÊGO, A. D., *et al.* Cadeia produtiva do mel: um plano de ação estratégico da produção do mel no contexto Maranhense. **X Seminário Internacional sobre Desenvolvimento Regional**, 2017.

RAMANAUSKIENE, K. *et al.* The quantitative analysis of biologically active compounds in Lithuanian honey. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1544–1548, 2012.

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**. V. 4, p. 271-275, 2003.

ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. **Apidologie**, v. 37, n. 2, 2006.

RUIZ-MATUTE, Ana I.; SANZ, M. Luz; MARTÍNEZ-CASTRO, Isabel. Use of gas chromatography–mass spectrometry for identification of a new disaccharide in honey. **Journal of Chromatography**, 1157.1-2: 480-483, 2007.

SILVA C. L. F. *et al.* Storage conditions significantly influence the stability of stingless bee (*Melipona scutellaris*) honey. **Journal of Apicultural Research**, 2021.

SILVA, R. N. A. **Biodiversidade de leveduras cultiváveis associadas ao mel e ao pólen das abelhas sem ferrão: Identificação por espectrometria de massas MALDITOF MS**. 2022. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências dos alimentos). Universidade de Federal da Bahia, Salvador.

SOUZA, B. A. *et al.* Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (*Apidae: Trigonini*) do estado da Bahia. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.4, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/ys4GT6M63kQ8V5RpNrv7Rjj/>. Acesso em: 7 Jun. 2023.

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

SOUZA, H. F. **Produção de hidromel por levedura probiótica**. 2022. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Pirassununga. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74132/tde-29072022-135949/pt-br.php>. Acesso em: 7 Jun. 2023.

SOUZA, H. F. *et al.* Growing conditions of *Saccharomyces boulardii* for the development of potentially probiotic mead: Fermentation kinetics, viable cell counts and bioactive compounds. **Food Science and Technology International**, 2023.

TEIXEIRA, A. C. P. *et al.* *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.

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

VIDAL, M. F. Desempenho da apicultura nordestina em anos de estiagem. **Caderno Setorial Etene**, ano II, n. 11, p. 1-10, 2017. Disponível em: https://g20mais20.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/267/1/2017_CDS_11.pdf. Acesso em: 6 Jun. 2023.

VIDAL, M. F. Mel natural. **Caderno Setorial Etene**, Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ano 7, n.219, 2022. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/handle/123456789/1198>. Acesso em: 6 Jun. 2023.

VILLAS BÔAS, J. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral dos Produtos das Abelhas Nativas Sem Ferrão**. Brasília – DF. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN). 2a edição. Brasil, 2018.

VIT, Patricia. Sour honeys from 57 species of stingless bees in 18 countries. **Bee World**, v. 99, n. 3, 2022. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/0005772X.2022.2079842?casa_token=X4oHzO1W8AIAAAAAA:cyMvm-hDYtw0IyySGWFcRNY2IMsFRT4G4n65Zuy1voq5FhgCPmdx394YteXy7fp9nOw-xsQuaaicLhiTFA. Acesso em: 18 Mai. 2023.

ŽEBRACKA, A., *et al.* Assessment of the microbiological quality and bactericidal properties of flavoured honey. **Med. Weter.** V. 78, n. 11, 2022.

ZIMMERMANN, F. K.; ENTIAN, K. D. **Yeast sugar metabolism**. CRC Press, 1997.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Brewers Publications, 2010.