



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS,
MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS EM AMOSTRAS DE MEL DE
ABELHAS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO GAMA**

Alexandre Bera

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do grau
de Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Dra. Susy Frey Sabato

São Paulo
2010

Aos meus pais:

Alberto Bera e

Marilene Pallotta Bera

A minha esposa:

Rejane Aparecida Lorençon Bera

Ao meu filho:

Gustavo Lorençon Bera

DEDICO

Agradecimentos

A Deus, por estar sempre presente na minha vida e permitir a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Susy Frey Sabato, pela orientação, confiança, amizade e apoio no decorrer deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN.

À Profa. Assoc. Ligia Bicudo de Almeida-Muradian, por permitir que parte deste trabalho pudesse ser desenvolvida no Laboratório de Análise de Alimentos da FCF-USP, também pelo companheirismo, incentivo na pesquisa e nas análises com FTIR-ATR.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Ao Laboratório CONFAR, em especial à Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e ao Dr. Felipe R. Lourenço, pela valiosa ajuda com as análises microbiológicas.

À SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda., especialmente ao Diretor técnico Dr. Mário Killner e ao Gerente técnico Dr. Laercio Goulart, pelo grande auxílio nas análises do *P. larvae*.

À Elizabeth S. R. Somessari e ao Carlos Gaia da Silveira, pela prontidão no atendimento, pelo profissionalismo e pela irradiação das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos da FCF-USP, Aline, Andréia, Cristina, Cynthia, Daniela, Ursula, Eli, Fabiana, Fernando, Flavia, Helena, Graziela, Ingrid, Illana, Isabel, Jaqueline, Juliana, Klaus, Lenny, Luciana, Nadia, Otilia, Renato, Rosa, Simone e Vanilda.

Aos funcionários e alunos do Centro de Tecnologia das Radiações, pelos auxílios quando necessários.

Ao Bee Research Centre (BRC) – Liebefeld, Berna, Suíça, pelo auxílio nas análises com FT-IR ATR.

Aos funcionários da divisão de ensino pelas informações, pela paciência e pela dedicação aos alunos.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida.

EFEITOS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS E SENSORIAIS EM AMOSTRAS DE MEL DE ABELHAS SUBMETIDAS À RADIAÇÃO GAMA

Alexandre Bera

RESUMO

A produção de mel no Brasil tem aumentado consideravelmente e vem ganhando destaque no mercado internacional, conseqüentemente muitas exigências passaram a fazer parte da cadeia produtiva apícola. Além das análises previstas na legislação brasileira, o mercado externo procura produtos que atendam aos mais rigorosos padrões de qualidade. O mel possui características interessantes devido a sua constituição, porém, existem problemas que podem alterar seu padrão de identidade e qualidade. A aplicação da radiação gama é uma proposta viável que promove a diminuição da carga microbiana sem alterar a constituição e as características físico-químicas, com perdas nutricionais menores quando comparada a outros tratamentos usados em alimentos. Neste estudo, além dos parâmetros físico-químicos exigidos pela legislação brasileira (MAPA), também foram incluídas outras análises pertinentes, inclusive a técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR). As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras de méis puros, nas quais, posteriormente, foram inoculadas cargas microbianas conhecidas para avaliar a ação da radiação gama nas doses de 5 e 10 kGy. O teste triangular foi utilizado na análise sensorial para diferenciar as amostras não-irradiadas das irradiadas. As maiores modificações nas amostras de méis foram, principalmente, nas concentrações de HMF (hidroximetilfurfural) e na atividade diastásica, ocorrendo diminuição significativa em todas as amostras analisadas. Houve redução na carga microbiana a partir da aplicação da dose de 5 kGy, atingindo a ausência com a aplicação de 10 kGy de dose, com exceção do *Paenibacillus larvae* que mostrou ser mais resistente. A análise sensorial realizada nas amostras de mel e mel irradiado, com doses de 5, 10 e 15 kGy, apontou não haver diferença significativa (5%) entre as amostras controle e irradiadas. A aplicação da radiação gama em méis mostrou ser um método muito útil na descontaminação microbiológica, apresentando poucas alterações no produto com doses de até 10 kGy.

Palavras-chave: mel; apicultura; radiação gama; controle de qualidade; análise físico-química; sensorial; hidroximetilfurfural; atividade diastásica; microbiologia; FTIR-ATR.

EFFECTS ON PHYSICOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND SENSORY CHARACTERISTICS OF HONEY BEE SAMPLES SUBMITTED TO GAMMA RADIATION.

Alexandre Bera

ABSTRACT

Honey production in Brazil has increased considerably and gaining prominence on the international market, as a result many demands have become part of the productive honey chain. In addition to the analyses provided for the Brazilian legislation, international market demand products that meet the most stringent quality standards. Honey has interesting characteristics due to its constitution, but even so there are problems that can change some how your identity and quality. The application of gamma radiation is a viable proposal which promotes the reduction of bioburden without changing the constitution and most importantly the physicochemical properties, with smaller nutritional losses when compared to other treatments used in foods. This study beyond the physicochemical parameters required by Brazilian regulation also included other relevant analyses, including FT-IR ATR. Microbiological analyses were carried out on samples of pure honeys and subsequently inoculated microbial known loads to assess the action of gamma radiation in doses of 5 and 10 kGy. The triangular test was used to differentiate the irradiated and not irradiated. samples The major changes that have occurred in samples of honeys were mainly in concentrations of HMF (hydroxymethylfurfural) and diastase activity occurring a significant decrease in all analyzed samples. There was a reduction microbiological from the application of the 5 kGy, reaching absence with 10 kGy dose except *Paenibacillus larvae*. The sensory analysis conducted on samples of honey and honey irradiated with 5, 10 and 15 kGy doses, pointed out that there is no significant difference (5%) between irradiated and control samples. The application of gamma radiation in honeys proved a very useful method in microbiological decontamination, featuring few changes in the product at doses up to 10 kGy.

Keywords: honey; apiculture; gamma radiation; quality control; physicochemical analysis; hydroxymethylfurfural; diastase activity; microbiology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Considerações gerais.....	13
1.2 Objetivos.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Apicultura no Brasil.....	16
2.2 Produção do Mel.....	18
2.3 Mel monofloral e multifloral.....	19
2.4 Qualidade do Mel.....	20
2.5 Análises físico-químicas.....	24
2.6 Análise por espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR).....	27
2.7 Características microbiológicas do mel.....	28
2.7.1 <i>Echerichia coli</i>	30
2.7.2 <i>Aspergillus niger</i>	31
2.7.3 <i>Clostridium esporogeneses</i>	31
2.7.4 <i>Paenibacillus larvae</i>	32
2.8 Características sensoriais do mel.....	33
2.9 Irradiação em alimentos.....	33
2.9.1 Radiação	35
2.10 Importância Econômica do Mel.....	37
2.10.1 Exportação do Mel.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 Amostra.....	40
3.2 Irradiação.....	40
3.3 Análises físico-químicas previstas na legislação.....	41
3.3.1 Umidade e brix.....	41
3.3.2 Hidroximetilfurfural	41
3.3.3 Atividade diastásica.....	41
3.3.4 Minerais/cinzas.....	42
3.3.5 Acidez livre.....	42
3.3.6 Sólidos insolúveis.....	42
3.3.7 Açúcares redutores e sacarose aparente.....	42

3.4	Análises físico-químicas não previstas na legislação.....	43
3.4.1	Teste de Fiehe.....	43
3.4.2	Reação de Lugol.....	43
3.4.3	Reação de Lund.....	43
3.4.4	Determinação do nitrogênio total / proteínas.....	43
3.4.5	Análise de cor.....	44
3.4.6	Atividade de Água.....	44
3.4.7	Condutividade elétrica	44
3.5	Espectroscopia no Infravermelho (FT-IR ATR)	44
3.6	Métodos microbiológicos.....	50
3.6.1	<i>Escherichia coli</i>	50
3.6.2	<i>Clostridium sporogenese</i>	50
3.6.3	<i>Aspergillus niger</i>	50
3.6.4	<i>Paenibacillus larvae</i>	51
3.7	Análise sensorial.....	52
3.8	Tratamento de resíduos químicos.....	52
3.9	Testes estatísticos.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	Propriedades físico-químicas em amostras de méis silvestre, laranjeira e eucalipto.....	53
4.1.1	Umidade e brix	53
4.1.2	Hidroximetilfurfural.....	54
4.1.3	Atividade Diastásica.....	56
4.1.4	Acidez livre e pH.....	58
4.1.5	Minerais e sólidos insolúveis.....	60
4.1.6	Açúcares redutores e sacarose aparente.....	62
4.1.7	Lund, Fiehe e Lugol.....	64
4.1.8	Proteínas.....	65
4.1.9	Atividade de água.....	65
4.1.10	Condutividade elétrica.....	66
4.1.11	Cor.....	67
4.2	Resultados das amostras de méis comerciais nas doses de 0 e 10 kGy.....	68

4.2.1 Umidade e brix.....	68
4.2.2 Hidroximetilfurfural.....	69
4.2.3 Atividade diastásica.....	71
4.2.4 Acidez livre e pH.....	73
4.2.5 Minerais e sólidos insolúveis.....	74
4.2.6 Açúcares redutores e sacarose aparente.....	75
4.2.7 Lund, Fiehe e Lugol.....	77
4.2.8 Proteínas.....	77
4.2.9 Condutividade elétrica.....	78
4.2.10 Atividade de água.....	79
4.2.11 Cor.....	80
4.3 Resultados das amostras de méis comerciais por FT-IR ATR com doses de 0 e 10 kGy.....	81
4.4 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de méis comerciais entre doses de 0 e 10 kGy.....	84
4.4.1 <i>Escherichia coli</i>	84
4.4.2 <i>Aspergillus niger</i>	86
4.4.3 <i>Clostridium sporogeneses</i>	89
4.4.4 <i>Paenibacillus larvae</i>	92
4.5 Análise sensorial.....	94
5 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE TABELAS

	Pág	
TABELA 1	Alguns parâmetros de qualidade adotados pelo codex alimentarius (1989) e pela legislação brasileira (brasil, 2000) para méis.....	21
TABELA 2	Escala PFUND	23
TABELA 3	Doses de irradiação em diferentes alimentos.....	36
TABELA 4	Resultados das análises de umidade e grau brix nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses 0 a 25 kGy.....	53
TABELA 5	Resultados das análises de HMF nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses 0 a 25 kGy.....	55
TABELA 6	Resultados das análises de atividade diastásica nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses 0 a 25 kGy.....	57
TABELA 7	Resultados das análises de acidez livre e pH nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses 0 a 25 kGy.....	59
TABELA 8	Resultados das análises de minerais e sólidos insolúveis nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses 0 a 25kGy.....	61
TABELA 9	Resultados das análises de açúcares redutores e sacarose aparente nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses 0 a 25kGy.....	63
TABELA 10	Resultados das análises de Lund, Fiehe e Lugol nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses 0 a 25 kGy.....	64
TABELA 11	Resultados das análises de proteínas para amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses 0 a 25 kGy.....	65
TABELA 12	Resultado da análise de atividade de água nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses 0 à 25 kGy.....	66

TABELA 13	Resultados das análises de condutividade elétrica nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses 0 a 25 kGy.....	67
TABELA 14	Resultado da análise de cor nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses 0 a 25 kGy.....	68
TABELA 15	Resultados das análises de umidade e grau brix nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.....	69
TABELA 16	Resultados das análises de HMF nas amostras de méis comerciais com doses de 0 e 10 kGy.....	70
TABELA 17	Resultados das análises de atividade diastásica nas amostras de méis comerciais com doses 0 e 10 kGy.....	72
TABELA 18	Resultados das análises de acidez livre pH nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.....	74
TABELA 19	Resultados das análises de minerais e sólidos insolúveis nas amostras de méis comerciais com doses de 0 e 10 kGy.....	75
TABELA 20	Resultados das análises de açúcares redutores e sacarose aparente nas amostras de méis comerciais com doses de 0 e 10 kGy.....	76
TABELA 21	Resultados das análises de Lund, Fiehe e Lugol nas amostras de méis comerciais nas doses de 0 e 10 kGy.....	77
TABELA 22	Resultados das análises de proteínas nas amostras de méis comerciais nas doses de 0 e 10 kGy.....	78
TABELA 23	Resultados das análises de condutividade elétrica nas amostras de méis comerciais nas doses de 0 e 10 kGy.....	79
TABELA 24	Resultados da análise de atividade de água nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.....	80
TABELA 25	Resultados da análise de cor nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.....	81
TABELA 26	Resultados das análises de frutose, glicose, sacarose, trealose, melezitose, maltose, isomaltose, erlose e turanose nas amostras de méis comerciais nas doses de 0 e 10 kGy por FT-IR ATR.....	83

TABELA 27	Resultados da contagem de <i>Escherichia coli</i> inoculada em amostras de mel não irradiado (0 kGy).....	85
TABELA 28	Resultados da contagem de <i>Escherichia coli</i> inoculada em amostras de mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy.....	85
TABELA 29	Resultados das amostras de mel não irradiado com <i>Aspergillus niger</i> inoculado.....	87
TABELA 30	Resultados da contagem de <i>Aspergillus niger</i> em amostras de mel irradiado com dose de 5 kGy.....	88
TABELA 31	Resultados da contagem de <i>Aspergillus niger</i> em amostras de mel irradiado com doses de 10 kGy.....	88
TABELA 32	Resultados da contagem de <i>Clostridium esporogeneses</i> , em amostras de mel não irradiado.....	90
TABELA 33	Resultados da contagem de <i>Clostridium esporogeneses</i> , em amostras de mel irradiado com dose de 5 kGy.....	91
TABELA 34	Resultados da contagem de <i>Clostridium esporogeneses</i> , em amostras de mel irradiado com dose de 10 kGy.....	91
TABELA 35	Resultados da contagem de <i>Paenibacillus larvae</i> em amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy.....	93

LISTA DE FIGURAS

	Pág
FIGURA 1	Classificação zoológica da abelha..... 16
FIGURA 2	Exportação de mel brasileiro..... 39
FIGURA 3a	Fotografia do equipamento usado para análise de FT-IR ATR fechado..... 46
FIGURA 3b	Fotografia do equipamento usado para análise de FT-IR ATR aberto..... 46
FIGURA 4	Esquema de um espectrômetro FT-IR..... 47
FIGURA 5	Espectro típico (FT-IR ATR) de amostras de méis (sobreposição de 30 amostras de méis)..... 47
FIGURA 6	Modelo de ficha de avaliação apresentada aos provadores..... 52
FIGURA 7	Teor de HMF nas doses de 0 a 25 em méis silvestre, laranjeira e eucalipto..... 56
FIGURA 8	Atividade diastásica em méis de eucalipto, laranjeira e silvestre irradiados com doses de 0 a 25 kGy..... 58
FIGURA 9	HMF em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com dose de 10 kGy..... 71
FIGURA 10	Atividade diastásica em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com dose de 10 kGy..... 73
FIGURA 11	Resultados da contagem de <i>Escherichia coli</i> , em amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy..... 86
FIGURA 12	Resultados da contagem de <i>Aspergillus niger</i> , em amostras de mel não irradiado e irradiado com doses de 5 e 10 kGy.... 89
FIGURA 13	Resultados da contagem de <i>Clostridium sporogeneses</i> , em amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy..... 92
FIGURA 14	Resultados da contagem das amostras de mel não irradiado e mel irradiado nas doses 5 e 10 kGy contaminadas com <i>Paenibacillus larvae</i> 93

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Considerações gerais*

O mel é produzido por abelhas melíferas, a partir do néctar das flores, do exsudado de plantas ou da excreção de insetos sugadores. Pode ser classificado em: monofloral, o mel constituído do néctar de uma única espécie floral ou quando a maior predominância for de uma única espécie floral; polifloral, quando constituído do néctar de mais de uma espécie floral; ou extrafloral, que não provem do néctar, sendo produzido a partir de exsudado de plantas ou restos de frutas (WHITE, 1980; ROSSI *et al.*, 1999). Basicamente, compreende uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. Sua composição química está condicionada a diversos fatores, entre eles: condições climáticas, espécies botânicas, raça da abelha, maturação do mel, estado fisiológico da colmeia e natureza do solo (CRANE, 1975; CRANE, 1987). Além dos açúcares em solução, o mel contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, acetilcolina, flavonoides, minerais e extensa variedade de compostos orgânicos que contribuem para cor, odor e sabor – e que até hoje ainda não são totalmente conhecidos. Todos esses compostos menores somados, representam, em massa, apenas uma pequena parcela da composição do mel (CAMPOS, 1987; SERRANO, 1994).

A apicultura é a criação de abelhas para a produção do mel e dos demais produtos provenientes da colmeia; é praticada em quase todos os países, sendo assim objeto de inúmeras pesquisas ao redor do mundo (PEREZ-ARQUILLUÉ *et al.*, 1994). O aumento na produção, conseqüentemente, fez com que a comercialização do mel também aumentasse e com ela surgissem problemas, como adulteração e contaminação, modificando as características próprias do produto (NOZAL *et al.*, 2000; CANO *et al.*, 1992).

Mesmo com o aumento da produção, o mel possui disponibilidade limitada e preço relativamente alto, propiciando assim a sua adulteração com produtos de valor comercial menor, como glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de sacarose invertida (ROSSI *et al.*, 1999). Por conta disso, foram criados métodos específicos para análise do mel pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990) e pela *Codex Alimentarius Commission*

(CAC, 1989), que pudessem estabelecer o controle da qualidade por intermédio de análises físico-químicas adequadas (BOGDANOV *et al.*, 1997).

Muitos desses métodos de análises, estabelecidos mundialmente, foram utilizados pela legislação brasileira não somente para constatar adulteração, mas também como indicador da qualidade do mel (BRASIL, 2000). Tradicionalmente, utilizam-se os seguintes métodos para detectar a adulteração do mel: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e Análise de Isótopos de Carbono. Porém, os mesmos consomem tempo, são destrutivos e geram significativos custos, por estarem associados com a compra de reagentes e ao respectivo descarte, sendo uma proposta viável a utilização do método de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.

Devido a problemas com contaminantes microbiológicos e tentativas de minoração desses, com técnicas de purificação que alteram de alguma forma as características obrigatórias do produto, no trabalho realizado por Migdal *et al.* (2000), foi aplicada a radiação gama, com dose de 10 kGy, verificando-se efetiva diminuição na carga microbiana, sem haver alterações significativas nas características físico-químicas do mel. Todos os resultados mantiveram-se dentro dos limites oficiais de qualidade nas pesquisas realizadas por Bera *et al.* (2008) nas amostras de méis irradiados. Porém, não existem trabalhos que analisem mais profundamente os efeitos da radiação aplicada em méis, principalmente nos do Brasil, que possuem composição diferenciada dos demais países, pelas suas riquezas naturais e diversidade biológica, além do clima tropical. A complexa composição do mel, o aumento na produção, no consumo e, principalmente, a falta de trabalhos publicados referentes às demais propriedades, contribuem para a necessidade de estudos mais detalhados envolvendo análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do produto após a irradiação.

O trabalho apresentado irá contribuir muito neste sentido, para o aumento das informações de fundamental importância, no que diz respeito ao controle de qualidade e principalmente utilizando a técnica da radiação, podendo dar a certeza de um alimento seguro, saudável e livre de contaminantes.

1.2 Objetivos

Este trabalho visa o estudo das características físico-químicas e microbiológicas do mel, após a aplicação da radiação gama, por intermédio dos parâmetros previstos pela legislação brasileira. Desta forma, objetivou-se:

- Avaliar as propriedades físico-químicas dos méis de floradas predominantes silvestre, laranjeira e eucalipto irradiados com a fonte de cobalto-60 em diferentes doses: 5, 10, 15, 20 e 25 kGy, comparando-as com o controle.
- Avaliar as propriedades físico-químicas de méis comerciais irradiados com a fonte de cobalto-60 com a dose de 10 kGy, comparando-as com o controle.
- Verificar o comportamento microbiológico de *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Clostridium sporogenes* e *Paenibacillus larvae* inoculados no mel antes e após aplicada a radiação gama com doses de 5 e 10 kGy.
- Avaliar, por intermédio da técnica de FT-IR ATR, algumas propriedades físico-químicas de méis comerciais irradiados com radiação gama, comparando-as com o controle.
- Avaliar os atributos sensoriais do mel irradiado com doses de 5, 10 e 15 kGy por meio da análise sensorial, comparando com o controle (teste triangular).

Contribuição original

Este trabalho engloba as informações necessárias para efetivamente comprovar as modificações físico-químicas e sensoriais que possam ocorrer no mel de diferentes floradas pela aplicação da radiação gama em diferentes doses e a diminuição ou a erradicação dos microrganismos patogênicos no mel. Não existe na literatura resultados dessas análises reunidas em um único trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Apicultura no Brasil

As abelhas se originaram de um grupo de vespas pertencentes à superfamília Sphecoidea que, passando por mudanças em seus hábitos alimentares, deixaram de se alimentar de ácaros e insetos e passaram a utilizar néctar e pólen para a obtenção de nutrientes. As abelhas pertencentes à família Apidae possuem estruturas especializadas para a coleta de pólen (corbícula), localizada nas pernas posteriores, também utilizadas para coleta de outros materiais úteis na colmeia (WIESE, 2000; SOUSA, 2007). Essas estruturas são utilizadas também para a realização da polinização, já que no momento que a abelha coleta o néctar ou mesmo o pólen ocorre a transferência desse pólen das anteras para os estigmas e, quando atinge o ovário da flor, ocorre a fecundação, gerando a produção de frutos (CRANE, 1987; WIESE, 2000; SOUSA, 2007).

A classificação zoológica atual da abelha encontra-se na FIG. 1.

Reino	Animal
Filo	Arthropoda
Classe	Insecta
Ordem	Hymenoptera
Subordem	Apocrita
Superfamília	Apoidea
Família	Apidae
Gênero	Apis
Espécie	<i>Mellifera</i>

FIGURA 1 – Classificação zoológica da abelha (WIESE, 2000; SOUSA, 2007)

As abelhas são classificadas como insetos pertencentes à família Apidae, subfamília Apinae e ao gênero Apis, o qual engloba uma série de espécies, que são responsáveis pela maior parte da produção de mel. As abelhas da espécie *Apis mellifera* caucásica, conhecidas como abelhas caucasianas, tiveram sua origem nos vales do Cáucaso Central, na Geórgia. São de grande interesse para os apicultores, devido a seu comportamento extremamente dócil, propiciando fácil

manuseio e certo controle devido a sua característica pouco enxameadora. Originárias dos Alpes europeus e da Rússia central, as *Apis mellifera mellifera* foram as primeiras abelhas do gênero introduzidas no Brasil pelo padre Antônio Carneiro, em 1949. Também conhecidas como abelhas-europa, elas também possuem temperamento dócil, porém ficam agitadas durante o manuseio. Adaptaram-se muito bem no Brasil, reproduzindo-se de maneira excelente; e são fáceis de serem controladas por também possuírem características pouco enxameadoras. Do continente africano, vieram as *Apis mellifera escutelata*, introduzidas no Brasil por volta de 1956, pelo pesquisador Doutor Warwick Etevam Kerr; seu comportamento é bem diferente quando comparado ao das demais abelhas. As africanas são abelhas muito agressivas, polinizadoras e enxameadoras. Além disso, as abelhas desta espécie normalmente estocam poucas quantidades de alimento.

Outras espécies de abelhas também foram trazidas para o Brasil, como *Apis mellifera ligustica*, da Itália; *Apis mellifera lamarckii*, do Vale do Nilo e *Apis mellifera carnica*, da Áustria e da Iugoslávia.

Um dos fatos mais marcantes da apicultura no Brasil foi quando as abelhas africanas, trazidas pelo Dr. Kerr enxamearam-se, e cerca de trinta colmeias se reproduziram em Camacã, na região de Rio Claro, no Estado de São Paulo, causando um incidente que resultou em alguns casos fatais, nas quais muitas pessoas foram picadas e muitos apicultores abandonaram suas atividades. A partir de então, novas pesquisas foram iniciadas com o intuito de entender e atenuar a agressividade dessas abelhas. Foi quando Dr. Kerr, com o auxílio dos pesquisadores Lionel Segui Gonçalves e Antonio Carlos Garros Stort, deu origem a um híbrido entre as espécies europeias e africanas, que são as abelhas africanizadas tão comuns hoje no Brasil (WIESE, 2000; KERR, 2002).

O que parecia, no início, um grande desastre passou a ser, de certa forma, uma melhoria da apicultura no Brasil. As abelhas africanas eram muito agressivas, armazenavam pouco mel e seu tamanho era pequeno em comparação com as europeias, que eram maiores, armazenavam muito mel e eram dóceis; porém, estas eram mais vulneráveis às doenças. Então, a abelha africanizada acabou adquirindo as melhores características das abelhas africanas e europeias (WIESE, 2000, KERR, 2002). Isso, em conjunto com o aprimoramento das técnicas apícolas, da tecnologia e do aumento das

exportações, fez com que a produção de mel no Brasil aumentasse de 4 mil toneladas por ano, em 1960, para 40 mil toneladas por ano, em 2008.

2.2 Produção do mel

O processo de formação do mel se inicia quando a abelha suga o néctar da flor e o armazena em sua bolsa melífera, o depositando, posteriormente, no alvéolo do favo no interior da colmeia. A partir daí, uma sequência de transformações ocorre, pois esse néctar passa pelo aparelho digestivo de várias abelhas, as quais o sugam e o depositam novamente no alvéolo, sucessivamente, implicando na perda de água. Nesse processo, as enzimas invertase, diastase e glicose oxidase, que são secretadas pelas glândulas salivares das abelhas, são adicionadas ao néctar e auxiliam na sua maturação (CANO, 2002; SPÜRGIN, 1997, SOUSA, 2007). O mel só estará pronto (maduro) quando atingir cerca de 20% de umidade: assim, o alvéolo é completado e em seguida operculado. Em uma colmeia, as abelhas conseguem controlar até certo ponto o teor de umidade e a temperatura no interior da caixa (CRANE, 1987).

O favo pode ser coletado da colmeia quando atingir mais de 75% de alvéolos operculados, para evitar problemas com umidade excessiva e ou contaminação microbiológica ou alteração organoléptica (WIESE, 2000).

O mel é processado em local específico, denominado casa do mel, onde existe todo um ambiente propício e normatizado pela ABNT (NBR15585, 2008), desenvolvido especialmente para esta prática. O processo de extração do mel é relativamente simples, mas, de acordo com a literatura, é durante esse procedimento que ocorrem as maiores contaminações no produto (TOSI *et al.*, 2002) .

Os procedimentos de extração do mel são:

- Recepção das melgueiras
- Desoperulação
- Centrifugação
- Filtração
- Decantação

- Envase
- Armazenamento

Em cada etapa do processo existe perigo de contaminação, necessitando de cuidados especiais. Por ser um produto higroscópico, o mel capta muito facilmente a umidade e, conseqüentemente, os odores do ambiente em que está sendo beneficiado (CRANE, 1975; TOSI *et al.*, 2002).

O mel também pode ser usado como ingrediente ou como compostos adicionados de própolis, geleia real ou pólen. No trabalho realizado por Bera (2004) foram estudadas amostras de mel adicionadas com concentrações de 2% e 5% de própolis, sem que houvessem alterações significativas nas características físico-químicas do produto.

2.3 Mel monofloral e multifloral

O mercado apícola vem crescendo muito nos últimos anos e, com isso, também o conhecimento e as exigências de um produto cada vez mais elaborado para determinado consumo. Para, isso torna-se necessário, antes de tudo, o conhecimento da origem botânica do mel, pois méis de determinadas floradas podem antecipar algumas informações, tanto para o controle de qualidade quanto para o comércio. A classificação entre mel monofloral e multifloral é um fator muito importante e de grande interesse para a apicultura, sendo muito estudada (MATEO e BOSH-REIG, 1998; SERRANO, 1994). Essa classificação é feita por uma análise microscópica, de forma que o mel pode ser considerado monofloral quando possui predominância maior que 45% do pólen de uma única espécie floral, portanto, quando não há predominância de espécie de pólen o mel é classificado como multifloral (MERCOSUL, 1995; MATEO e BOSH-REIG, 1998).

No Estado de São Paulo, a maior procura é pelo mel de laranjeira devido ao seu sabor cítrico suave e à coloração clara. A produção é feita em pomares onde é cultivada essa fruta, sendo restrita somente na época de florada da laranjeira. O mel proveniente das flores silvestres é encontrado em maior abundância, sendo possível sua produção durante o ano todo; possui grande variedade de cores, odores e sabores, de acordo com a florada visitada e do néctar coletado pelas abelhas. As áreas de plantio do eucalipto vem aumentando

relativamente, por ser uma planta de reflorestamento, podendo ser utilizada de diversas maneiras. O mel proveniente dessa planta é mais um produto rentável nessa diversificação, possui sabor agradável e tem sido bem aceito pelo consumidor (KOMATSU *et al.*, 2002, CANO *et al.*, 2001).

2.4 Qualidade do mel

Os parâmetros de qualidade utilizados para atestar a pureza do mel estão relacionados no *Codex Alimentarius Commission, Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, Regulamento técnico MERCOSUL e Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, conforme descrito na TAB. 1:

TABELA 1 - Alguns parâmetros de qualidade adotados pelo Codex Alimentarius (1989) e pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) para méis.

Critério de qualidade	Codex Alimentarius	Legislação brasileira
Umidade em % (máximo)	21	20
Açúcares redutores em % (mínimo)		
Mel floral	65	65
Mel de melato ou misturas com mel floral	60	60
Sacarose aparente em % (mínimo)		
Mel floral	5	5
Mel de melato ou misturas com mel floral	15	15
Sólidos insolúveis em água em % (máximo)		
Mel centrifugado	0,1	0,1
Mel prensado	0,5	0,5
Conteúdo mineral (cinzas) em % (máximo)		
Mel floral	0,6	0,6
Mel de melato ou misturas com mel floral	1,2	1,0
Acidez em mEq/ kg (máximo)		
	50	50
Atividade diastásica (mínimo)		
HMF maior que 15 mg/kg	8	8
Méis com HMF menor que 15mg/kg	3	3
HMF em mg/kg (máximo)		
	60	60

Fonte: (ALMEIDA-MURADIAN e PENTEADO, 2007)

De acordo com a Instrução Normativa Nº 11 de 2000, o mel é um

produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia.

O mel é um dos produtos da colmeia que possui maior utilização tanto “*in natura*” quanto em formulações industriais.

Para se obter a quantificação detalhada das características físico-químicas do mel, este deve ser submetido a algumas análises, dentre as principais, pode-se descrever as exigidas pela legislação brasileira (BRASIL, 2000), que são: umidade, HMF (hidroximetilfurfural), açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis e atividade diastásica.

O aumento do interesse internacional pelo mel fez com que vários trabalhos tenham sido desenvolvidos, fazendo com que o número de métodos para análise de suas características aumentasse, aumentando também a sua precisão (LACHMAN *et al.*, 2007).

Os teores de HMF e a atividade diastásica sempre foram estudados como sendo os fatores mais importantes para o controle de qualidade do mel. O HMF é considerado um importante parâmetro de qualidade do mel e seus valores máximos são estabelecidos por vários órgãos, que estão relacionados com o país responsável pela produção desse mel (FALLICO *et al.*, 2004). A qualidade do mel pode ser afetada pela formação do HMF e a diminuição da atividade diastásica, que normalmente se dá pelo aquecimento excessivo ou armazenamento prolongado (MENDES *et al.* 1998), conseqüentemente ocasionando a perda de frescor (BATH e SINGH, 1999). O aquecimento do mel pode ocorrer por alguns fatores, como nas colmeias localizadas em regiões de clima quente, ocorrendo naturalmente e também para modificar a tendência à cristalização ou na tentativa de destruir microrganismos que possam ser prejudiciais às características do produto (TOSI *et al.*, 2002).

O processo de cristalização e o tamanho dos cristais no mel estão ligados à umidade, à relação glicose/frutose e à temperatura a que este produto permaneceu exposto. Algumas desvantagens estão relacionadas à cristalização, como a dificuldade na própria manipulação no entreposto, pela dificuldade em passar o mel nesse estado de um recipiente para outro; dessa forma a dosagem fica comprometida, além dos equipamentos não funcionarem corretamente. Uma boa parte dos consumidores também prefere o mel no estado líquido, evitando o produto cristalizado. Normalmente, quando a cristalização ocorre, é comum nos entrepostos, ou até mesmo entre os apicultores, o aquecimento do mel até liquefazê-lo novamente, aplicando, muitas vezes, temperaturas superiores às recomendadas (TOSI *et al.*, 2002).

A análise da atividade de água é um importante fator a ser utilizado, além da umidade, pois está mais relacionada com os microrganismos no mel, pelo risco de fermentação, que também pode ser causada pela ação das leveduras osmotolerantes (ZAMORA *et al.*, 2006; ABRAMOVIC *et al.*, 2008). No trabalho de Zamora *et al.*, (2006) é feita uma correlação entre a umidade e a atividade de água no mel e especificado um limite entre 0,61 e 0,62 de aw como segurança para evitar o crescimento de leveduras osmotolerantes. A atividade de água é um parâmetro que determina a água disponível no alimento para o metabolismo microbiano; a água ligada às macromoléculas, por forças físicas, não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas e, portanto, não pode ser aproveitada pelos microrganismos (FRANCO e LANDGRAF, 1996; DENARDI *et al.*, 2005).

A cor do mel é proveniente do néctar das plantas, as quais possuem infinidade de tonalidades; portanto, existem muitos fatores a serem levados em consideração, além da análise da cor. Méis que possuem tonalidades mais claras, normalmente de *citrus sp*, possuem valor agregado mais elevado em comparação a outros tipos de méis, porém em determinadas regiões méis escuros ainda são mais apreciados (BOGDANOV *et al.*, 2004).

O armazenamento prolongado causa um escurecimento gradativo no mel. A escala Pfund é utilizada para classificar a cor do mel, que pode variar de branco d'água à âmbar escuro, conforme TAB. 2 (WIESE, 2000).

TABELA 2 – Escala PFUND

COR	PFUND em mm
Branco d'água	1 a 8
Extra branco	8 a 17
Branco	17 a 34
Extra âmbar claro	34 a 50
Âmbar claro	50 a 85
Âmbar	85 a 114
Âmbar escuro	mais de 114

(WIESE, 2000)

Além dos físico-químicos, outros parâmetros devem ser levados em consideração para reforçar a qualidade do mel, tais como as características microbiológicas e sensoriais.

2.5 Análises físico-químicas

A análise do teor de umidade do mel é feita por meio do índice de refração. Este depende do material sólido presente na amostra e pode variar muito, dependendo do tipo de mel, variação geográfica, condições de processamento, de embalagem e de armazenamento (ANUPAMA *et al.* 2002; ISENGARD e SCHULTHEIB, 2003). É um parâmetro importante para avaliar a qualidade do produto, especialmente quando se necessita de vida de prateleira considerável (ABRAMOVIC *et al.*, 2008). O teor de umidade do mel não pode exceder 20%, como forma de prevenção da fermentação causada pela ação de microrganismos que se desenvolvem facilmente em umidade elevada (FARIA, 1993; ISENGARD *et al.*, 2001; CAVIA *et al.*, 2002). Muitos fatores estão diretamente relacionados à umidade, como o sabor, a cor, o aroma, a viscosidade e a densidade do mel, sendo este um dos parâmetros mais importantes para as análises físico-químicas, a estabilidade e a conservação do produto (CANO *et al.*, 2001; CAVIA *et al.*, 2002; ISENGARD e PRÄGER, 2003).

O HMF é um aldeído cíclico formado pela desidratação ácida dos monossacarídeos e pode ser um composto tóxico quando encontrado em quantidades muito elevadas, razão pela qual se faz necessária a sua determinação em méis. Este composto é também encontrado naturalmente em todos os produtos que contenham água com monossacarídeos em meio ácido. Pode também ser formado pela reação de Maillard (JANZOWSKI *et al.*, 2000; NOZAL *et al.*, 2001, TOSI *et al.*, 2002). No mel, o HMF é um indicador da qualidade que auxilia na identificação de um produto fresco, quando apresenta baixas concentrações, ou que tenha sido aquecido, estocado em condições inadequadas ou adulterado com xarope invertido, quando existir em altas concentrações (WHITE, 1980; STRONG e DUARTE, 1985; VIÑAS *et al.*, 1992; COCO *et al.*, 1996, BATH e SING, 1999; NOZAL *et al.*, 2001). Para constatar a presença do HMF no mel pode-se utilizar uma reação qualitativa, estabelecida nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985), ou seja, o teste de

Fiehe. Na quantificação do HMF é utilizado o método espectrofotométrico na região do UV-Vis a 284 e 336 nm (BOGDANOV *et al.*, 1997). A concentração máxima permitida pela legislação brasileira é de 60 mg de HMF por kg de mel (BRASIL, 2000).

Os açúcares constituem de 65 a 80% dos sólidos solúveis do mel e, dentre os principais, estão os monossacarídeos glicose e frutose, que também são os mais abundantes (LEITE *et al.*, 2000; KOMATSU *et al.*, 2002). Os dissacarídeos, como sacarose, maltose, turanose e trealose, são encontrados em menores concentrações, entre 3 e 10%, e os oligossacarídeos, tais como erlose, maltotriose e rafinose, estão presentes em concentrações muito pequenas: menos de 1% (CRANE, 1987; SWALLOW e LOW, 1990).

Açúcares não-redutores, como a sacarose, servem como parâmetros de pureza do mel, porém, quando detectada em grande quantidade, pode caracterizar adulteração, tanto na alimentação das abelhas, quanto na adição direta no mel (MENDES *et al.*, 1998). O limite máximo tolerável no Brasil para sacarose aparente é de 5%, para mel de flores, e 10%, para o mel de melato (BRASIL, 2000).

A determinação de cinzas no mel pode constatar irregularidades na produção, como falta de higiene e beneficiamento incorreto. De acordo com a legislação vigente, o máximo permitido de cinzas é de 0,6%, para mel de flores, e de 1,0%, para o mel de melato (BRASIL, 2000).

Os ácidos orgânicos contribuem para o odor e o sabor do mel e, dependendo do grau de acidez, podem favorecer a proliferação de microrganismos, reduzindo sua qualidade (MATO *et al.*, 1998). O pH do mel é, em média, 3,9, sendo que o ácido de maior predominância é o glicônico, produzido pela ação da enzima glicose-oxidase, presentes nas glândulas hipofaríngeas das abelhas. Outros ácidos encontrados no mel são: fórmico, acético, benzoico, butírico, cítrico, láctico, maleico, málico, oxálico e fenilacético (CRANE, 1987). De acordo com a legislação vigente, deve ser realizada a análise da acidez livre, baseada na titulação potenciométrica; o máximo de acidez livre permitida no mel é de 50 miliequivalentes/kg (BRASIL, 2000).

A determinação de sólidos insolúveis é um método para constatar adulteração e contaminação do mel por substâncias insolúveis em água. O teor

máximo permitido de sólidos insolúveis em água no mel é de 0,1%, para o mel centrifugado, e de 0,5%, para o prensado (BRASIL, 2000).

A atividade diastásica é um parâmetro de qualidade que indica o frescor do mel, podendo indicar também o superaquecimento ou problemas acarretados pelo armazenamento prolongado ou inadequado do produto (SANCHO *et al.*, 1992; BOGDANOV *et al.*, 1999). O mínimo de atividade diastásica permitida pela legislação brasileira é de 8 na escala de Gothe, se o teor de HMF for maior que 15 mg/kg e 3, se o HMF não exceder 15 mg/kg, de mel (BRASIL, 2000).

A primeira propriedade percebida pelo consumidor é a cor do mel; cuja determinação é um parâmetro de classificação do mel, que pode variar de branco água até tonalidades mais escuras como âmbar escuro (BOGDANOV *et al.*, 2004). A variação da cor também está relacionada a sua origem botânica, clima, solo, umidade e altitude (WIESE, 2000).

Outro parâmetro que auxilia na classificação do mel é a condutividade elétrica, incluída recentemente aos novos padrões internacionais do mel (CODEX ALIMENTARIUS, 2001; EUROPEAN COMMISSION, 2002). O método de análise da condutividade elétrica está descrito em Bogdanov *et al.* (1997).

Algumas análises que auxiliam no controle de qualidade do mel estão descritas no livro Métodos físico-químicos para análise de alimentos (SAKUMA *et al.*, 2005): a) reação de Lund, que detecta a presença de albuminoides no mel. b) Fiehe, que analisa qualitativamente a presença de substâncias produzidas durante o superaquecimento ou pela adição de xaropes de açúcar no mel. c) Lugol que pesquisa a presença de amido e dextrinas (WIESE, 2000; BERA e ALMEIDA-MURADIAN, 2007; SAKUMA *et al.*, 2005).

As proteínas desempenham uma função importante na nutrição humana, e possuem propriedades organolépticas de textura e também podem estar combinadas com lipídeos e carboidratos (CECCHI, 1999). O mel contém pouca quantidade de proteínas, que são provenientes das abelhas e, em casos raros, de algumas espécies de plantas (CRANE, 1987; BERA e ALMEIDA-MURADIAN, 2007).

2.6 Análise por espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier com acessório de reflexão total atenuada (FT-IR ATR)

A técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier, com acessório de reflexão total atenuada (FT-IR ATR), vem sendo utilizada na predição dos parâmetros físico-químicos do mel (RUOFF *et al.*, 2006; ALMEIDA-MURADIAN, 2009). Com o avanço tecnológico é possível o desenvolvimento de ferramentas cada vez mais sofisticadas, as quais podem trazer benefícios como a redução no tempo ou até mesmo de custo nas análises. Esta técnica tem sido utilizada por pesquisadores de diversas áreas, por detectar diversas alterações em vários tipos de produtos; sendo rápida, necessitando de pouca quantidade de amostra, dentre outros fatores (REID, 2006; TOZETTO *et al.*, 2007).

No trabalho de Lichtenberg-Kraag *et al.* (2002) foi utilizada a técnica do FT-IR como método alternativo que não utilizasse reagentes caros ou com alta toxicidade e pudesse ser usado nas rotinas de laboratório.

A FT-IR ATR, que se constitui em um método espectroscópico vibracional (infravermelho próximo ou médio), em combinação com a análise estatística multivariada de dados, mostrou ser uma técnica rápida, não destrutiva, econômica, com elevado nível de confiança e bem estabelecida para a análise quantitativa de alimentos, inclusive a de mel. Este método pode ser utilizado como uma técnica óptica sensível para se obter “impressões digitais bioquímicas” das amostras, de modo rápido e com menores riscos para produzir artefatos, se comparada a outras técnicas, constituindo-se como uma metodologia válida para a caracterização qualitativa do mel (RUOFF *et al.*, 2006; BERTELLI *et al.*, 2007; ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

Tradicionalmente, utilizam-se os seguintes métodos para detectar a adulteração do mel: Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG) e Análise de Isótopos de Carbono. Porém, os mesmos consomem tempo, são destrutivos e geram custos significativos por estarem associados com a compra de reagentes e seus respectivos descartes (RUOFF *et al.*, 2006; ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

Por outro lado, métodos que utilizam o infravermelho possuem a velocidade, a simplicidade e o custo baixo por análise necessários para tais técnicas de *screening* e têm sido aplicados para resolver vários problemas de autenticidade dos alimentos. Esses métodos têm sido usados para determinar a composição química e a sua aplicação na detecção de adulterantes do mel por vários xaropes de açúcares (KELLY *et al.*, 2006; BERTELLI *et al.*, 2007, ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

A química analítica moderna mudou fundamentalmente nos últimos anos, devido à introdução de técnicas de avaliação quimiométricas, as quais abrangem todos os métodos de calibração multivariada na química analítica. Comparada à clássica calibração univariada, esta técnica usa não somente um ponto específico do espectro do infravermelho (IV), mas toda a informação espectral, de modo que mesmo as menores diferenças nos espectros da amostra possam ser identificadas (CONZEN, 2006; ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

2.7 Características microbiológicas do mel

Apesar de o mel ser um produto estável, com baixa concentração de água e alta concentração de açúcares, além dos parâmetros físico-químicos, são necessárias as análises microbiológicas, devido à presença de esporos de diversos microrganismos, que podem ser encontrados com certa facilidade no produto. Os microrganismos do gênero *Bacillus* e *Clostridium* podem ser encontrados com regularidade, sendo que o *Clostridium* sulfito-redutor é um indicador de contaminação do mel (SNOWDON e CLIVER, 1996; HILLEGAS e DEMIRCI, 2003; FINOLA *et al.*, 2007).

A contaminação microbiológica do mel se dá por diversas maneiras, que podem estar ligadas diretamente à abelha ou aos procedimentos de coleta. No primeiro caso inclui-se néctar, pólen, poeira, trato digestivo da abelha, terra e ar. Quanto aos procedimentos, seriam: contaminação cruzada, falta de higiene (pessoal e material), equipamentos e instalações (SNOWDON e CLIVER, 1996).

No trabalho de Rall *et al.* (2003), 3% das amostras analisadas no Estado de São Paulo continham esporos de *C. botulinum*. Em 2006, Kuphulu *et al.*, encontraram *C. botulinum* em cerca de 12,5% dos méis comercializados em

Ankara na Turquia. A presença de esporos de *Clostridium botulinum* no mel pode provocar o botulismo infantil, principalmente se ingerido por crianças com até um ano de vida, nas quais o sistema imunológico não se encontra completamente desenvolvido (HAUSCHILD *et al.* 1988; HUHTANEN, 1991; AUSTIN, 1998; MIGDAL *et al.*, 2000; RALL *et al.*, 2003; FINOLA *et al.*, 2007).

Ragazini *et al.* (2008) encontraram em seu estudo, 39% de bactérias sulfito-redutoras, sendo 11% do gênero *Clostridium*, dos quais 7% eram *C. botulinum* e 28% do gênero *Bacillus*.

Na pesquisa realizada por Martins *et al.* (2003), foram detectadas, em 51,3% do total de 80 amostras, a presença do *Aspergillus niger* na concentração de 10^2 UFC/g, além de outros microrganismos ainda em maior concentração, como *Bacillus cereus*, *Penicillium spp* e *Saccharomyces sp*.

A doença denominada Loque Americana, também conhecida como cria pútrida americana (CPA), é responsável por grandes perdas relacionadas diretamente às colméias. Ocorre quando *Paenibacillus larvae*, na forma de esporo, infecta a glândula hipofaríngea da abelha, podendo ser transmitido para as larvas e ao próprio mel, daí ser disseminado para qualquer parte do mundo onde esse mel for comercializado (GRAAF *et al.*, 2001). Trata-se de uma bactéria do grupo Gram-positivo, de catalase negativa e de seus esporos termoestáveis e resistentes a produtos químicos, dificultando o tratamento pelos métodos convencionais. Para diagnosticar a presença de *P. larvae* foram criadas a Portaria Nº. 248 (BRASIL, 1998), que aprova as metodologias para a pesquisa dessa bactéria no mel, e a Instrução Normativa Nº. 62 (BRASIL, 2003), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas no controle de produtos de origem animal e água.

De modo geral, os microrganismos patogênicos são responsáveis por inúmeras perdas, tanto na área da saúde, quanto na produção agrícola. Hoje, mais do que nunca, são necessárias técnicas para minimizar a presença desses agentes nos alimentos, especialmente no mel. O avanço da tecnologia tem aprimorado as técnicas de análise, tornando-as mais rápidas e precisas, melhorando, assim, a qualidade dos produtos. Mas, por outro lado, grandes quantidades de alimentos ainda são descartadas todos os dias por problemas indicados nessas análises. A RDC Nº. 12 (BRASIL, 2001^b) estabelece os padrões

microbiológicos sanitários para alguns alimentos, incluindo o mel, e determina os critérios para a conclusão e a interpretação dos resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano.

Alguns estudos têm sido realizados nesse sentido, como no trabalho de Barhate *et al.* (2003), que utilizou técnicas de microfiltração polimérica e membranas de ultrafiltração, com o intuito de diminuir as quantidades de leveduras, porém comprometendo a ação das enzimas no mel.

As técnicas mais utilizadas atualmente são as que envolvem o tratamento térmico, como a pasteurização. No trabalho de Tosi *et al.* (2002), foram analisadas amostras de méis que foram submetidas a temperaturas elevadas em determinados períodos de tempo. Este procedimento pode destruir as vitaminas e os bionutrientes, além de causar diminuição na atividade diastásica, que mede a quantidade das enzimas principalmente α -glicosidase (invertase), α -amilase e β -amilase (diastase), verificando-se ainda aumento progressivo do HMF.

2.7.1 *Echerichia coli*

A *Echerichia coli*, mais comumente denominada *E. coli*, pertencente à família das enterobactérias, é um bacilo aeróbio e anaeróbio facultativo com coloração Gran-negativa. Pode ser usada como indicador da presença de coliformes fecais em alimentos, pois esse microrganismo é proveniente do contato com fezes humanas ou de animais. Essa bactéria se desenvolve bem em meios de culturas artificiais e forma ácidos na presença de glicose e lactose (FRANCO e LANDGRAF, 1996; ICMSF, 2000).

Problemas acarretados pela falta de higiene, ligados à manipulação dos alimentos, são as principais causas de contaminação por microrganismos, o mesmo ocorrendo no mel.

A *E. coli* é considerada uma bactéria patogênica, podendo agir no intestino dos seres humanos e dos animais, causando vários transtornos.

No trabalho de Ebrahimi e Lotfalian (2005) foi estudada a resistência da *E. coli* no trato digestivo da abelha, mostrando que 77,77%, das 45 cepas estudadas desse microrganismo, apresentaram resistência a um ou mais antibióticos. Pouco se sabe sobre a resistência de antibióticos nas abelhas e no mel, porém é certo

que a resistência das bactérias a antibióticos vem aumentando em todo o mundo e, conseqüentemente, acarretando problemas para a saúde pública (TESSI *et al.*, 1997).

2.7.2 *Aspergillus niger*

Fungos englobam uma série de microrganismos; dentre os filamentosos destaca-se um dos mais importantes usados em biotecnologia, o *Aspergillus Níger*, que funciona como indicador importante da eficiência de práticas de sanitização de equipamentos e utensílios durante a produção e o beneficiamento de alimentos, assim como a maioria dos bolores e leveduras. Além disso, podem estar associados à produção de metabólitos tóxicos e à deterioração de alimentos (SHUSTER *et al.*, 2002; OLEMPSKA-BEER, 2008).

Aspergillus é um gênero de fungos que apresenta coloração branca amarelada com formação de pedúnculos e uma ponta colorida. São importantes agentes decompositores de alimentos e devem ser manuseados com muito cuidado para evitar a formação de esporos (SCHUTER *et al.*, 2002).

Cerca de 16 a 20 espécies podem infectar o ser humano causando aspergilose, sendo as mais comuns: *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*. As manifestações clínicas vão desde reações de hipersensibilidade (aspergilose alérgica) até formas pulmonares e cerebrais (aspergiloma ou bola fúngica).

Fungos filamentosos estão presentes no meio ambiente como um todo, com crescimento aeróbio em matéria orgânica e resistência à variação de temperatura e de pH (OLEMPSKA-BEER, 2008).

2.7.3 *Clostridium esporogeneses*

O *Clostridium esporogeneses* é da mesma família que o *Clostridium botulinum* e possui propriedades similares de resistência à temperatura e à luz, dentre outros parâmetros (HILLEGAS e DEMIRCI, 2003). Vários métodos têm sido estudados como meios de inativação de *C. esporogeneses* e *C. botulinum*, tais como: microndas, aquecimento convencional, radiação gama, tratamento de pressão hidrostática (HUGHTANEN, 1991; CRAWFORD *et al.*, 1996). Hillegas e Demirci (2003) utilizaram uma técnica envolvendo luz-UV, na tentativa de reduzir

a quantidade dos esporos de *C. sporogeneses* em mel, mas sem sucesso, devido à insuficiência no poder de penetração.

2.7.4 *Paenibacillus larvae*

A cria pútrida americana (*American foulbrood*) é uma das principais doenças que atingem as abelhas, causando prejuízos imensos para apicultura. O agente causal *Paenibacillus larvae* é uma bactéria Gram-positiva, de catalase negativa, formadora de esporos que são termoestáveis e extremamente resistentes a produtos químicos (BRASIL, 1998; KOCHANISKY *et al.*, 2001; NEUENDORF *et al.*, 2004; LINDSTRÖM *et al.*, 2008). As larvas das abelhas são sensíveis à infecção até 53 horas após a eclosão dos ovos e os principais sintomas da doença são morte das larvas após a infestação por esporos, tanto das abelhas, como da rainha e dos zangões, mesmo com as células operculadas. A disseminação pode-se dar de diversas maneiras, como a seguir: pela transferência de favos contaminados com restos larvais de uma colmeia para outra ou quando já foram extraídos o mel e ficarem expostos para as abelhas, as quais terminam de extrair o mel restante, levando-o para a colmeia.

O mel contaminado pode ser um veículo de transmissão entre as abelhas, que sentem seu odor à distância, mesmo depois de embalado ou até mesmo depois de usado e descartado com a tampa aberta, pois as abelhas, podem sugar parte desse mel e assim contaminar a colônia. É necessário cuidado redobrado quando o mel for importado de regiões onde possuem casos da doença (BRASIL, 1998; WIESE, 2000; GRAAF *et al.*, 2001; NEUENDORF *et al.*, 2004; LINDSTRÖM *et al.*, 2008).

O controle é feito com a aplicação de antibióticos, como a oxitetraciclina, que tem sido muito usada nos Estados Unidos contra a cria pútrida americana. No trabalho de Koshansky *et al.* (2001) foram testados 27 antibióticos, sendo os mais eficazes os comumente utilizados na agricultura: a eritromicina, a lincomicina, a monensina e a tilosina. A preocupação na aplicação de antibióticos é a resistência que as bactérias adquirem, fazendo com que progressivamente maiores quantidades de medicamentos sejam necessárias para a redução microbiana (KOSHANSKY *et al.*, 2001). O resíduo de medicamentos no produto também é uma importante preocupação. A determinação de resíduos de

medicamentos veterinários em alimentos destinados ao consumo humano tem sido muito discutida nos comitês científicos do Ministério da Saúde, da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e na Organização Mundial da Saúde (OMS). Após o problema de contaminação da China, aumentaram as necessidades de validação de novos métodos de detecção para facilitar e viabilizar aplicação nas áreas de toxicologia de alimentos, fármacos e cosméticos (REYNES, 2009). Assim sendo, o mel não pode conter aditivos (MERCOSUL, 1995; BRASIL, 2000).

2.8 Características sensoriais do mel

O mel possui características sensoriais próprias, variando muito de acordo com as propriedades físico-químicas, as origens botânica e geográfica (WHITE, 1975, CRANE, 1987; ANUPAMA *et al.*, 2002). A análise sensorial é utilizada para avaliar o estado de frescor dos alimentos; no caso do mel, leva-se em consideração também a sua aparência, por exemplo. Os atributos sensoriais normatizados pela ABNT (NBR 12806, 1993) são: aparência, odor e aroma, sensação bucal e sabor (ANUPAMA *et al.*, 2002; RODAS *et al.*, 2004). Diferentes métodos de análises sensoriais podem ser utilizados para diferentes propósitos, tais como: orientação para o controle de qualidade, desenvolvimento de novos produtos, teste de aceitação e preferências por determinados produtos; sendo uma ferramenta muito útil na área de alimentos (ALMEIDA *et al.*, 1999, DUTCOSKY, 1996). Os analistas sensoriais expressam suas opiniões em cabines individuais, nas quais recebem o produto a ser analisado, usando uma metodologia científica reconhecida internacionalmente, acompanhado de um formulário com perguntas pré-definidas para a determinação dos resultados. Os testes sensoriais podem ser discriminativos, descritivos, afetivos ou com escalas. Dentre os testes discriminativos está o teste triangular (NBR 12995), que auxilia na detecção de pequenas diferenças entre amostras (SAKUMA *et al.*, 2005).

2.9 Irradiação em alimentos

As técnicas de irradiação vêm sendo aplicadas nas mais diversas áreas de estudo, com diversos propósitos, porém destaca-se sua aplicação nos alimentos,

principalmente os já embalados prontos para a comercialização. A aplicação da radiação é uma proposta viável que promove a diminuição da carga microbiana sem alterar a constituição e, o mais importante, mantendo as características físico-químicas, com perdas nutricionais menores quando comparada a outros tratamentos usados em alimentos. Nos trabalhos de Huhtanen (1991), Migdal *et al.* (2000) e Lemma *et al.* (1999) foram aplicadas técnicas de irradiação gama com o intuito de minimizar a presença dos microrganismos, sem alteração nas características próprias dos alimentos estudados. A radiação gama teve pequena influência sobre os parâmetros físico-químicos de mel, bem como sobre suas propriedades reológicas, demonstrando que o processo de irradiação pode ser aplicado a méis.

Nos alimentos são utilizadas as radiações ionizantes, sendo permitidas somente fontes de: ^{60}Co e ^{137}Cs (raios gama), Raios -X (com fótons de energia não superiores a 5 MeV) e feixes de elétrons acelerados com energia máxima de 10 MeV. Desse modo, a energia gerada não é suficiente para induzir radioatividade e o alimento não entra em contato com a fonte de radiação. A radiação eletromagnética é uma energia em forma de ondas, enquanto que a radiação pela emissão de elétrons é corpuscular e se dá pela aceleração da velocidade dos elétrons; durante este movimento é realizada a transmissão de energia. A unidade utilizada para medir a quantidade de energia absorvida pelo material irradiado é o Gray (Gy). Um Gy é igual a um Joule (J) por quilograma de material absorvedor, que equivale a 100 rad (unidade antiga) (ICGFI, 1992).

A radiação atua no DNA (ácido nucleico), ionizando ou excitando-o, assim como em outras moléculas. Entretanto, essas alterações nas moléculas podem modificar a mensagem que ele carrega, diferenciando na reprodução e no funcionamento das células. As alterações ocorridas nas células são proporcionais às doses; assim, quanto mais elevadas, maiores serão as modificações, podendo levar à esterilização ou até mesmo à morte das células (ICGFI, 1992).

No mel, a contaminação comumente é constatada pela presença de esporos de bactérias aeróbicas, bolores e leveduras, que diminui efetivamente com a aplicação da radiação, com doses de até 10 kGy, com pequenas alterações não significativas nas propriedades organolépticas e físico-químicas (MIGDAL *et al.*, 2000). No trabalho de Bera *et al.* (2009) foram realizadas

algumas análises físico-químicas em amostras de méis comerciais irradiados com radiação gama, com poucas modificações nas características do produto.

No trabalho de lemma *et al.* (1999) foi aplicada a radiação gama no suco de laranja, com doses de 2,0; 4,0 e 6,0 kGy, obtendo-se redução eficaz da população microbiana e pequenas variações nos teores de sólidos solúveis, acidez titulável e pH. Muitas pessoas ainda têm certo receio no consumo de alimentos irradiados, temendo que a radiação a que o alimento é submetido lhe seja passada. O processo radioativo não pode aumentar o nível de radioatividade normal dos alimentos, ou seja, após a exposição à radiação gama, os alimentos não ficam radioativos, independentemente do tempo de exposição ou da dose absorvida, não fazendo, portanto, mal algum à saúde e estando prontos para consumo (ICGFI, 1992).

No Brasil, a legislação para alimentos irradiados é a Resolução RDC N^o. 21, de 26 de janeiro de 2001^a, regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Neste regulamento técnico fica estabelecido que a radiação ionizante pode ser utilizada em qualquer tipo de alimento. Porém, a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e os atributos sensoriais dos alimentos (BRASIL, 2001^a).

2.9.1 Radiação

A radiação natural ou de fundo é proveniente de elementos naturais radioativos existentes na crosta terrestre, como potássio, carbono, urânio, tório, céσιο, entre outros. Nossos antepassados sempre estiveram expostos a ela e nós também estamos, pois a intensidade dessa radiação tem permanecido constante por milhares de anos. A descoberta da radiação artificial e o desenvolvimento de técnicas de produção de radioisótopos serviram e ainda servem de incentivo para muitos pesquisadores ao estudo de suas aplicações em diferentes ramos da ciência (ICGFI, 1992).

Os raios gama provenientes das fontes radioativas naturais, artificiais e os que surgem nas reações nucleares artificiais têm ampla aplicação na ciência e na tecnologia. Com estes raios se destroem tumores cancerosos, se radiografam enormes lingotes de metal (de espessura até 250 mm) e peças acabadas na

busca de defeitos ocultos, se conservam e esterilizam produtos alimentícios e medicamentosos e se realizam investigações científicas em outras áreas da ciência moderna, entre outras aplicações.

Na TAB. 3 são mostrados alguns exemplos da utilização da radiação e suas respectivas doses.

TABELA 3 – Doses de radiação em diferentes alimentos

Dose	Propósito	Exemplo de Produto
Baixa (até 1 kGy)	Inibição do crescimento de brotos e outros alimentos. Morte de larvas e insetos encontrados no trigo, farinha, frutas e outros vegetais após colheita Diminuição no processo de amadurecimento Morte de parasitas associados com alimentos	Batata, cebola, alho, gengibre, bananas, manga, outras frutas não cítricas, cereais, legumes, vegetais e carne
Média (1 – 10 kGy)	Diminuição elevada ou eliminação de certos microrganismos ou parasitas que causam apodrecimento de alimentos Redução ou eliminação dos microrganismos patogênicos	Peixe fresco, morango, uva, vegetais desidratados, frutos do mar fresco e congelado, carne de porco fresca ou congelada e carne
Alta (10-50 kGy)	Esterilização de alimentos variados desde refeições para pacientes em hospital que só podem consumir alimentos livre de bactérias Eliminação de algumas doenças causadas por vírus Descontaminação de alguns aditivos e ingredientes	Carne, carne de porco, frutos do mar e outros alimentos preparados para dietas de hospital, temperos, fermento, goma natural

(CRAWFORD e RUFF, 1996)

Um dos fatores mais importantes a ser levado em consideração na irradiação de alimentos é a dose usada no produto; a exposição deve ser adequada para produzir os resultados desejados, mantendo a qualidade do produto. Em muitos países existem orientações de doses específicas para diversos *commodities* (CRAWFORD e RUFF, 1996). Na indústria alimentícia, a radiação atua ionizando alguns átomos e alterando a estrutura de moléculas vitais de bactérias e microrganismos, provocando sua morte; entretanto, os alimentos não sofrem os efeitos nocivos nem se tornam radioativos. Alguns problemas

podem ocorrer em relação ao processo de esterilização, como mudança no sabor, na cor e na textura, dependendo do alimento (CRAWFORD e RUFF, 1996).

A radiação ionizante pode inativar parasitas, protozoários ou helmintos e reduzir significativamente o crescimento de bactérias em peixes, aves, frutos do mar e carnes vermelha. Essa inativação microbiana é decorrente principalmente da alteração de ácidos nucleicos e pelos efeitos oxidativos dos radicais originários da radiólise da água. As diferenças na sensibilidade dos microrganismos frente à radiação estão relacionadas a diferenças em sua estrutura física e química e na sua capacidade em se recuperar dos danos causados pela irradiação. Por esta razão, a quantidade de energia requerida para controlar os microrganismos nos alimentos varia de acordo com a resistência da espécie e com o número de microrganismos presentes. Além disso, outros fatores, como composição do meio, teor de umidade, temperatura durante a irradiação, presença ou ausência de oxigênio, se o produto está fresco ou congelado, influenciam na resistência à radiação, particularmente no caso de células vegetativas (FARKAS, 2006, PODADERA, 2007).

2.10 Importância econômica do mel

O interesse pelo mel se iniciou há muito tempo e durante muitos anos se manteve grande, principalmente devido às características adoçantes, sendo o único produto natural com essa propriedade até 1900, quando gradualmente foi substituído pelo açúcar da cana (CRANE, 1975). A alta produtividade das abelhas fez com que grande número de pessoas se interessasse pela apicultura, tornando esta uma atividade rentável e gerando um aumento na produção apícola. A produção de mel no Brasil, em 2000, estava em torno de 20 mil toneladas/ ano (IEA, 2005). Apesar de estar aumentando (MARTINS *et al.*, 2003), poderia ser dez vezes maior (MARCHINI, 2000). Estima-se que o consumo brasileiro esteja em torno de 500 g de mel por indivíduo, por ano, sendo considerado baixo quando comparado ao de alguns países da Europa, que chegam a consumir 1.500 g per capita (VILCKAS *et al.*, 2003).

A produção brasileira de mel aumentou aproximadamente 37,3% entre 2000 e 2003, segundo o Instituto de Economia Agrícola (IEA), atingindo a média

de 30 mil toneladas/ ano; já a produção mundial de mel aumentou em média 4,6%. O valor das exportações de mel brasileiro em 2004 ultrapassou 42,3 milhões de dólares, se aproximando dos países líderes do mercado mundial.

O maior produtor de mel em 2003 foi a China, com 275,9 mil toneladas, seguida pelos Estados Unidos, com 82,1 mil toneladas, Argentina e Turquia, com 75,0 mil toneladas. Apesar dos Estados Unidos serem o segundo maior produtor de mel, também são o segundo maior importador, sendo a Alemanha a maior importadora mundial e a Argentina o maior exportador de mel, com cerca de 159,9 milhões de dólares (IEA, 2005).

Em 2006, o Brasil ocupava a 11ª posição na lista dos principais produtores de mel (IBGE, 2010), chegando a cerca de 36 mil toneladas de mel, somando aproximadamente 187 milhões de reais (IBGE, 2010). O Brasil possui um potencial muito significativo na produção do mel: estima-se que a capacidade de produção seja em torno de 200 mil toneladas de mel por ano.

A produção de mel teve aumento de 8,8% em 2008, comparativamente a 2007. O mel brasileiro tem adquirido importância nacional e internacionalmente. Limoeiro do Norte (CE), Apodi (RN) e Picos (PI) são os principais produtores nacionais de mel (IBGE, 2010).

Os dados de produção são difíceis de serem coletados e, no caso específico do mel, é ainda mais complicado, sendo provável que vários países ainda não tenham computado todo o impacto das exportações em suas produções de mel (IEA, 2005).

A China, que sempre dominou o mercado, teve problemas sanitários em sua produção, comprometendo profundamente as exportações, principalmente para a União Europeia. As colmeias foram infectadas pela *Varroa jacobsonii*, uma espécie de ácaro, que pode causar infestações, de difícil erradicação, exigindo constante tratamento (WIESE, 2000). No caso da China, toda produção foi contaminada por antibióticos à base de “clorafenicol”, utilizado na tentativa de controlar a varroa (CRIAÇÃO COMUNICAÇÕES, 2004).

Problemas como este, reforçam ainda mais a importância de números mais expressivos de trabalhos, com o intuito de minimizar problemas com contaminantes, sejam eles químicos ou biológicos.

2.10.1 Exportação do mel

As exportações do mel brasileiro passaram a ser um bom negócio logo após a China ter perdido seu maior importador, a União Europeia, quando ocorreu elevação no preço desse produto. Após a entrada do Brasil no mercado de exportação, os números têm aumentado consideravelmente e as perspectivas para os próximos anos é que o consumo de mel se mantenha em crescimento no mundo. O comércio internacional deve continuar; entretanto, existe a necessidade de se melhorar o padrão de identidade e qualidade (PIQ) do mel e a produtividade das colmeias, para que se tenha uma garantia de mercado (SOUSA, 2007).

A qualidade e a variedade do mel brasileiro vem conquistando mercado a cada dia; além dos países que sempre importaram nosso produto, como Estados Unidos, Canadá e Alemanha, o Brasil também tem exportado para uma série de países novos.

Na FIG. 2 é possível verificar o aumento das exportações nos últimos anos.

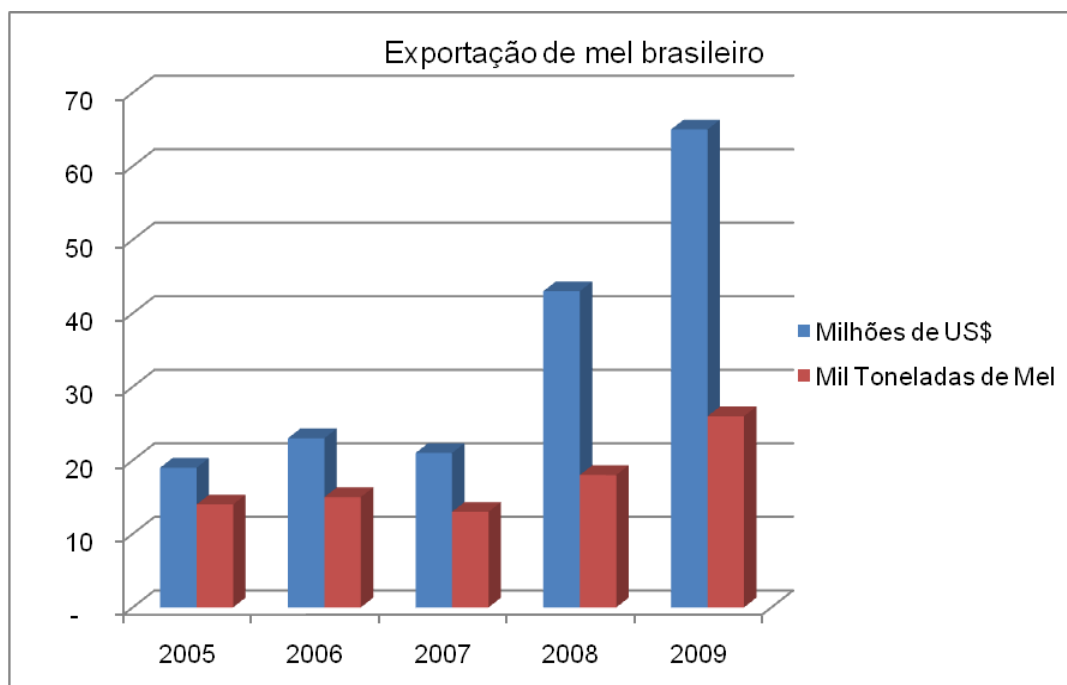


FIGURA 2 - Exportação de Mel Brasileiro

(FONTE – ABEMEL, 2010)

A produção apícola nacional teve aumento muito significativo devido às exportações. Nos últimos cinco anos, essa progressão passou de

aproximadamente 18 mil toneladas em 2005, gerando faturamento de mais de 43 milhões de dólares, mantendo-se em ascensão no período, para mais de 25 mil toneladas, com valor superior a 65 milhões de dólares em 2009, conforme dados obtidos do site da ABEMEL.

A Confederação Brasileira de Apicultura (CBA), juntamente com as associações estaduais, tem criado programas de modernização para a apicultura, como o programa de georreferenciamento, cadastro de apicultores, bem como a implantação das boas práticas apícolas, produtividade e análise dos pontos críticos de controle (APPCC), visando melhorar os padrões técnicos da apicultura no país (CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTURA, 2007; ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

As amostras de méis com floradas predominantes silvestres, laranjeira e eucalipto foram coletadas de várias colmeias, obtidas diretamente de apiários que possuíam essas floradas. As 7 amostras de méis comerciais foram adquiridas, aleatoriamente, de diferentes fontes: entrepostos de mel e estabelecimentos comerciais, em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

3.2 Irradiação

Foi utilizada um irradiador com fonte de ^{60}Co (Gammacell 220 AECL – Atomic Energy of Canada Ltd), localizado no Centro de Tecnologia das Radiações do IPEN – CNEN/SP. A atividade em (novembro de 2009) era: 2.472,86 Ci, com taxa de dose de 2,04 kGy/h, a taxa de dose e a atividade são corrigidas mensalmente pelo fator de correção do decaimento do Cobalto-60, portanto a cada mês temos um tempo diferente de irradiação para cada dose. As irradiações foram realizadas à temperatura ambiente. O processo de irradiação foi aplicado no mel embalado em potes de vidro com tampa metálica. Um pote de mel de cada lote a ser irradiado foi reservado para a comparação nas análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Os procedimentos seguiram o

regulamento técnico para irradiação de alimentos, Resolução RDC Nº. 21 (BRASIL, 2001a).

3.3 Análises físico-químicas previstas na legislação brasileira de mel

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – SP.

3.3.1 Umidade e brix

O método refratométrico, preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e pela AOAC (1990 - item 969.38B), foi utilizado para a análise de umidade no mel. Empregando-se o refratômetro de digital, marca Krüss, modelo DR201-97, converteu-se o índice de refração obtido para a umidade, com o auxílio da tabela de Chataway, com correção para 20°C (ALMEIDA-MURADIAN e BERA, 2008).

3.3.2 Hidroximetilfurfural (HMF)

Este método determina a concentração do hidroximetilfurfural (HMF) por espectrofotometria, no comprimento de onda de 284 nm. Para evitar interferência com outras substâncias, é feita previamente uma clarificação da solução de mel com bissulfito de sódio a 0,20%. O conteúdo de HMF é calculado, após a subtração da absorbância de fundo a 336 nm, conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2000), AOAC (1990 - item 980.23) e (BOGDANOV *et al.*, 1997).

3.3.3 Atividade diastásica

A determinação da atividade diastásica foi realizada baseada no método de Schade modificado por White e Hadorn, no que a coloração azul, desenvolvida pela reação de uma solução padrão de amido com solução de iodo, varia de intensidade em função da concentração da enzima diastase contida na amostra de mel, em condições padrões estabelecidas. A diminuição na intensidade da coloração foi medida em intervalos de 5 minutos. Com essa medida foi feita uma plotagem da absorbância contra o tempo e, pela equação de regressão, foi

determinado o tempo requerido para alcançar o fator de absorvância de 0,235. O número de diastase (DN) foi calculado dividindo-se 300 pelo tempo encontrado. A unidade de atividade diastásica, também conhecida como unidade de Gothe, é definida como o volume (mL) de solução de amido a 1% hidrolizada pela enzima presente em 1 g de mel por 1 hora a 40°C (BRASIL, 2000) e (CAC, 1989 - item 7.7).

3.3.4 Minerais (cinzas)

O método utilizado foi o gravimétrico para determinação de cinzas, com incineração em mufla a 550°C (BRASIL, 2000) e (CAC, 1989 - item 7.5).

3.3.5 Acidez livre

A acidez livre do mel é o conteúdo de todos os ácidos livres, expressos em mEq/kg (miliequivalentes/quilogramas de mel) (BOGDANOV *et al.*, 1997). O método baseia-se na titulação potenciométrica de uma solução de 10 g de mel em 75 mL de água livre de CO₂ com solução de hidróxido de sódio (BRASIL, 2000) e (AOAC, 1990 - item 962.19).

3.3.6 Sólidos insolúveis

O método aplicado foi o gravimétrico para a determinação dos sólidos insolúveis, no qual se dilui o mel com água destilada a 80°C e filtra-se em cadinhos porosos, conforme preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e CAC (1989 - item 7.4).

3.3.7 Açúcares redutores e sacarose aparente

Os açúcares redutores e a sacarose aparente foram determinados conforme indicado na legislação brasileira (BRASIL, 2000). O método utiliza a titulometria com reagente de Fehling, conforme o “Codex Alimentarius” (CAC - 1989 - item 7.1 e 7.2) e BOGDANOV *et al.* (1997)

Além das análises previstas na legislação brasileira, outras análises físico-químicas, que também auxiliam no controle de qualidade do mel foram realizadas (itens 3.4.1 a 3.4.7)

3.4 Análises físico-químicas não previstas na legislação

3.4.1 Teste de Fiehe

O teste de Fiehe baseia-se na detecção qualitativa do hidroximetilfurfural (HMF) resultante da desidratação da frutose, obtida por hidrólise ácida da sacarose. Este derivado do furfural reage com a resorcina, resultando em coloração que varia do rosa ao vermelho. Considera-se o teste positivo quando a coloração é avermelhada (SAKUMA *et al.*, 2005).

3.4.2 Reação de Lugol

O iodo e o iodeto de potássio reagem na presença de glicose comercial, resultando em reação de coloração de vermelho-violeta a azul. A intensidade da cor depende da quantidade de destrinas presentes na glicose. Considera-se a reação positiva quando a coloração é violeta-azul (SAKUMA *et al.*, 2005).

3.4.3 Reação de Lund

Esta reação baseia-se na precipitação de proteínas naturais do mel pelo ácido tânico; a leitura é feita após 24 horas, observando-se o precipitado no fundo da proveta. A reação é considerada positiva, indicando a presença de mel puro, quando o precipitado variar de 0,6 a 3,0 mL no fundo da proveta (SAKUMA *et al.*, 2005).

3.4.4 Determinação do nitrogênio total (proteínas)

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para conversão destes em proteínas (AOAC, 1990).

3.4.5 *Análise de cor*

As análises de cor foram realizadas no aparelho em um colorímetro modelo C221-Honey color analyzer, marca Hanna Instruments. Para a classificação do valor da leitura foi utilizada a tabela da escala Pfund (WIESE, 2000)

3.4.6 *Atividade de água*

A atividade de água foi realizada conforme descrito por Zamora *et al.* (2006) e Abramovic *et al.* (2008), no aparelho Thermocontanter Humidat – TH2/TH1, marca Novassina.

3.4.7 *Condutividade elétrica*

A condutividade elétrica no mel foi realizada no condutivímetro, marca Crison, modelo EC-Meta Basic 30⁺ conforme descrito por Bogdanov *et al.*, (1997).

3.5 *Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier, com acessório de reflexão total atenuada (FT-IR ATR)*

Esta análise foi realizada utilizando-se medida direta do mel no equipamento Bruker® Tensor 27, seguindo as condições descritas por Ruoff *et al.* (2006a) e Almeida-Muradian (2009). A fotografia do equipamento em questão está apresentada na FIG. 3.

Condições de análise

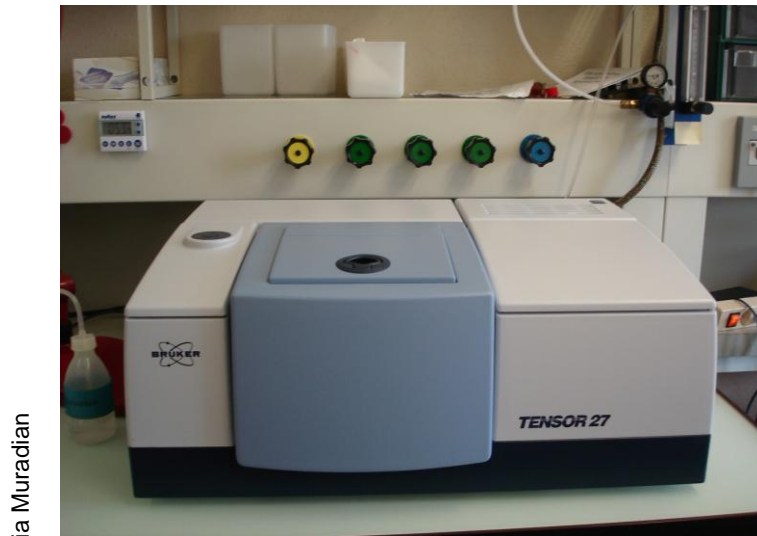
Equipamento: foi utilizado um espectrômetro FT-IR ATR "Tensor 27" (Bruker Optik GmbH, Germany), localizado no Bee Research Centre (BRC) – Liebefeld, Berna, Suíça, configurado com detector DLATGS, divisor de feixe de KBr e fonte GlobalTM, cobrindo a faixa espectral de 350 cm⁻¹ a 8.000 cm⁻¹.

Para amostragem foi utilizado um acessório de reflectância total atenuada (ATR) modelo Golden Gate (Specac Inc., UK), cuja célula de medida consiste num diamante de 2,8 mm com um índice de refração de 2,4 a 1.000 cm⁻¹. Foi

utilizado no equipamento em questão o *software* "Opus 6.5" (Bruker Optik GmbH, Germany).

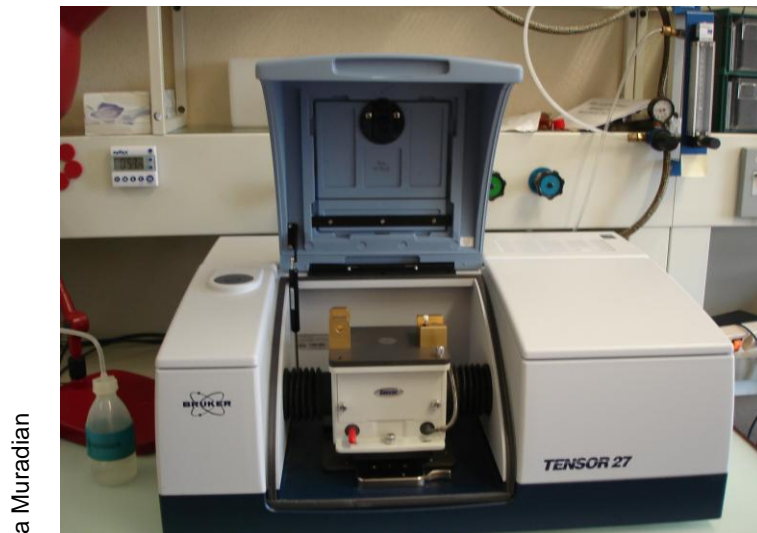
Pré-tratamento das amostras para a análise no FT-IR ATR: as amostras foram liquefeitas em estufa a 55 °C por 8 horas e depois deixadas resfriar à temperatura ambiente antes da análise.

Análise: após o pré-tratamento, uma gota de cada amostra foi aplicada à superfície do diamante e foi deixado equilibrar termicamente por 4 minutos. O número de varreduras foi selecionado na base da otimização sobre a razão do sinal-ruído em função do tempo de aquisição necessário por espectro. Cem varreduras foram gravadas para cada espectro na escala do número e onda entre 4.000 e 550 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} . O espectro de todas as amostras foi gravado, descontando-se a absorbância de fundo (em relação ao ar da superfície limpa do diamante à temperatura ambiente) a fim de apresentar a absorbância do espectro. Dois espectros foram gravados à temperatura ambiente usando-se alíquotas diferentes de cada amostra. Após cada medida, o diamante foi lavado com água do sistema Milli-Q e seco com um papel absorvente macio.



Ligia Muradian

(a)



Ligia Muradian

(b)

FIGURA 3 - Fotografia do equipamento usado para a análise de FT-IR ATR (a) fechado e (b) aberto, mostrando o acessório de reflectância total atenuada (ATR)

O esquema que mostra as partes do FT-IR pode ser visualizado na FIG. 4.

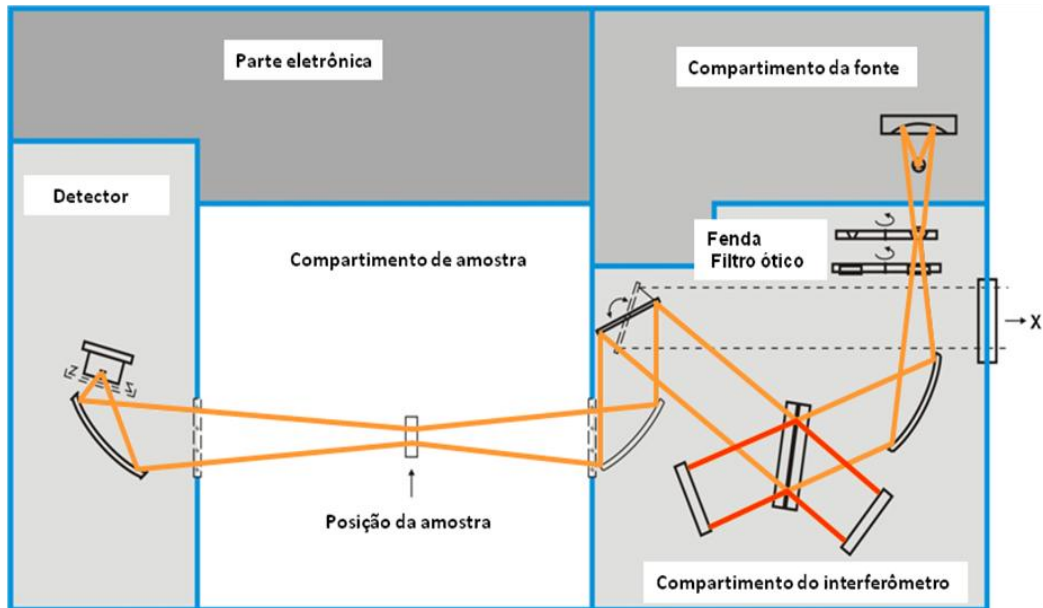
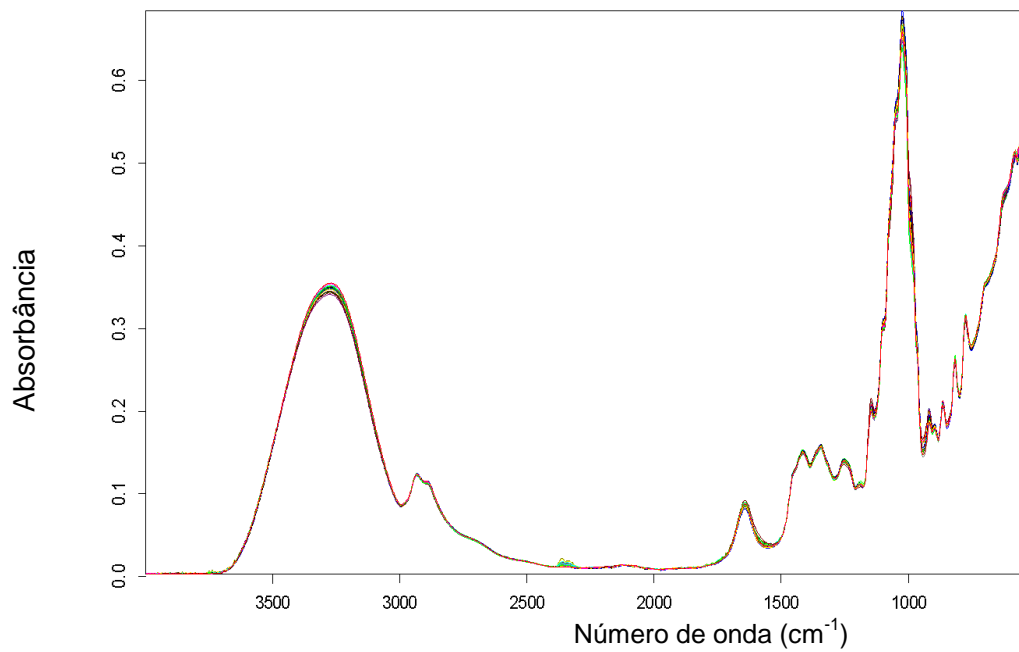


FIGURA 4 - Esquema de um espectrômetro FT-IR Fonte: BRUKER OPTICS e ALMEIDA-MURADIAN, 2009.

Pode-se, ainda, observar na FIG. 5 um espectro característico das amostras de mel analisadas.



Fonte: ALMEIDA-MURADIAN, 2009

FIGURA 5 - Espectro típico (FT-IR ATR) de amostras de méis (sobreposição de 30 amostras de méis)

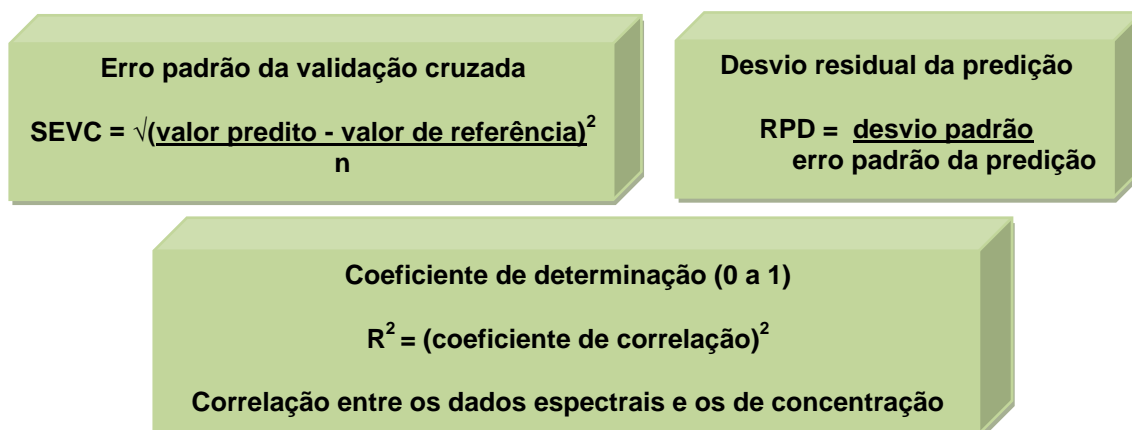
Modelo quimiométrico de quantificação

Para desenvolver o modelo quimiométrico, utilizaram-se amostras de mel com composição conhecida para calcular uma função de calibração (modelo matemático) que pode ser usada para análise de amostras desconhecidas futuramente, após a avaliação quanto à sua capacidade de predição (validação interna e externa) (ALMEIDA-MURADIAN, 2009).

A calibração multivariada foi realizada pela regressão PLS utilizando-se os dados espectroscópicos e os valores das concentrações correspondentes a cada analito. Esta parte do trabalho foi baseada no modelo descrito no trabalho de Ruoff *et al.* (2006 a) e Almeida-Muradian, (2009), utilizando-se o *software* "Opus 6.5 module Quant 2" .

Calibração e validação

A validação interna da calibração (validação cruzada e etapa nº 2), realizada por regressão PLS, foi executada para testar diferentes modelos da calibração para a predição dos vários analitos. Os parâmetros dos modelos de calibração avaliados nessa etapa de validação foram o erro padrão da validação cruzada (SECV), o desvio residual da predição (RPD) e o coeficiente de determinação (R^2) (fórmulas e cálculos a seguir).

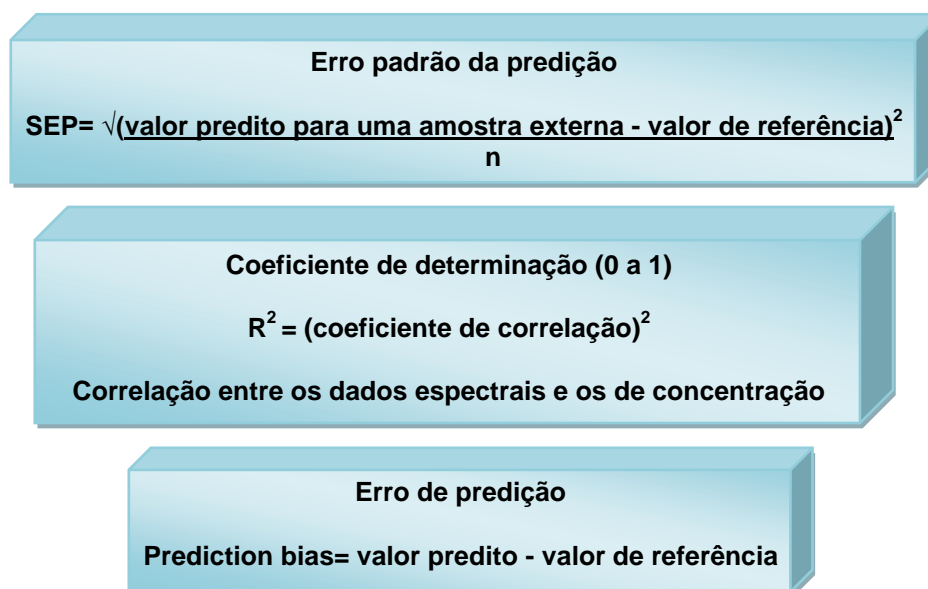


Fonte: ALMEIDA-MURADIAN, 2009

Para excluir o ruído dos espectros foram usadas para a calibração PLS somente as faixas entre 3.700 e 2.400 e entre 1.800 cm^{-1} e 700 cm^{-1} . A técnica de análise multivariada PCA, que trabalha com todas as variáveis estudadas

simultaneamente, foi utilizada para identificação e eliminação dos valores aberrantes (*outliers*) e, após a eliminação dos *outliers* espectrais e de concentração, os modelos foram ajustados com dois espectros por amostra.

A validação externa com amostras independentes (por grupo de teste e etapa nº 3) foi realizada com espectros da metade das amostras, selecionados aleatoriamente e não estando presentes no grupo das amostras usadas para construir o modelo. O erro padrão da predição (SEP), os coeficientes da determinação (R^2) e o erro de predição (*prediction bias*) foram calculados visando-se a avaliação dos resultados obtidos nessa etapa da validação do modelo (fórmulas e cálculos a seguir).



Fonte: ALMEIDA-MURADIAN, 2009

Em ambos os processos de validação, para obtenção de um modelo com maior acurácia e menor chance de erro, buscou-se a minimização do SECV e do SEP e a maximização do R^2 .

Além disso, visando facilitar a avaliação dos modelos gerados, levaram-se em consideração as classificações existentes para o desvio residual da predição (RPD) propostas por Cosen (2006), assim como Williams e Norris (2004):

- RPD de 0 a 2,3: método com desempenho muito ruim, não recomendado
- RPD de 2,4 a 3: método com desempenho ruim, recomendado apenas para *screenings* brutos

- RPD > 3: método bom para *screening*
- RPD > 5: método bom para controle de qualidade
- RPD > 6,5: método excelente para todas as aplicações analíticas para controle de processos

3.6 Métodos microbiológicos

As análises microbiológicas para *Escherichia coli*, *Clostridium esorogeneses* e *Aspergillus niger* foram adquiridas e realizadas no Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas (CONFAR), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP-SP. As amostras de mel foram contaminadas com esses microrganismos em triplicata, em seguida foram irradiadas com radiação gama no CTR-IPEN e, depois de irradiadas as amostras, retornaram para o CONFAR para que fosse realizada a contagem dos microrganismos.

Devido ao grau de especificidade do *Paenibacillus larvae*, esta análise foi realizada pelo SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda.

3.6.1 *Escherichia coli*

Na pesquisa da *E. coli* foi utilizada a técnica do número mais provável descrito em ICMSF (2000) e USPC (2009).

3.6.2 *Clostridium esporogenese*

Na pesquisa da *C. esporogenese* foi utilizada a técnica do número mais provável em anaerobiose descrito em ICMSF (2000) e USPC (2009).

3.6.3 *Aspergillus niger*

Na pesquisa da *Aspergillus niger* foi utilizada a técnica do número mais provável descrito em ICMSF (2000) e USPC (2009).

3.6.4 *Paenibacillus larvae*

O procedimento foi uma adaptação dos métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água – Instrução Normativa Nº. 62, capítulo XIX, 2003.

Inicialmente foi realizada verificação da pureza da cepa recebida do IAL. Assim, a cultura foi repicada em Ágar *Paenibacillus larvae* (ATCC 9545) (SCHUNCH *et al.*, 2001), incubada a 35-37°C por 3 a 6 dias. Após esse período a pureza foi verificada pela observação da morfologia das colônias, coloração de Gram e teste de catalase. A esporulação foi feita a partir de cepa recebida do IAL, a cultura foi repicada em Ágar *Paenibacillus larvae* (SCHUNCH *et al.*, 2001), incubada a 35-37°C por 10 dias. A pureza foi verificada novamente pela observação da morfologia das colônias e a confirmação da presença de esporos foi confirmada pela coloração de Wirtz. A partir dessa cultura foi preparada uma suspensão em solução fisiológica, a qual foi tratada a 80°C por 10 minutos, seguida de resfriamento em banho de água gelada, com o objetivo de eliminar as formas vegetativas.

A contaminação do mel ocorreu a partir da suspensão de esporos. Foi transferido 1 mL para 100 g de mel e foram preparados 9 frascos. Os frascos foram contaminados numa sexta-feira e disponibilizados na segunda-feira.

Para a análise foi feita a homogeneização do mel; em seguida, pesados 10 g e diluídos em 90 mL de solução salina peptonada 0,1% (diluição 1:10), homogeneizadas e preparadas diluições decimais seriadas (1:100; 1:1.000 e 1:10.000).

A partir de cada diluição foi inoculado 0,1 mL em superfície de Ágar *Paenibacillus larvae* (em duplicata). Para a diluição 1:10 foi inoculado 1 mL. Após espalhamento e absorção da amostra, as placas foram incubadas a 35-37°C por 6 dias. Após a incubação foram feitas as contagens, aplicados os fatores de diluição e o resultado expresso em UFC/g.

3.7 Análise sensorial

Os procedimentos utilizaram o teste triangular, o qual auxiliou na percepção dos atributos sensoriais do mel e do mel irradiado. Os dados das análises foram registrados em uma ficha (FIG. 6) de identificação, para anotação dos dados, a serem analisados estatisticamente, para a avaliação dos resultados (SAKUMA *et al.*, 2005). As amostras foram oferecidas aos provadores em copos descartáveis.

Amostra: _____ Julgador _____ Data: ____/____/____
Você está recebendo 3 (três) amostras de mel codificadas. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, avalie o sabor das amostras da esquerda para a direita. Circule a amostra diferente.
Comentários: _____

FIGURA 6 - Modelo de ficha de avaliação apresentada aos provadores (ABNT, 1993^a; SAKUMA *et al.*, 2005)

3.8 Tratamento de resíduos químicos

Os resíduos químicos, gerados nas análises físico-químicas foram encaminhados para serem incinerados, junto ao programa de tratamento de resíduos químicos da FCF/USP (Comissão de Descartes Laboratoriais).

3.9 Testes estatísticos

Os dados foram analisados com o auxílio do programa Statistica, usando o teste T de Student, seguindo os procedimentos descritos por Costa Neto, (1977).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Propriedades físico-químicas em amostras de méis silvestre, laranjeira e eucalipto

4.1.1 Umidade e brix

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas em amostras de méis silvestre, laranjeira e eucalipto estão apresentados nas TAB. 4 a 14.

Na TAB. 4 estão apresentados os resultados obtidos para a umidade e o grau brix.

TABELA 4 - Resultados das análises de umidade e grau brix nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Umidade (%) e Brix (%)					
	Silvestre		Laranjeira		Eucalipto	
0	17,0	81,0	16,2	81,6	17,4	80,4
5	17,0	81,0	16,2	81,6	16,6	81,2
10	16,6	81,4	16,2	81,6	17,0	80,7
15	16,6	81,4	16,2	81,6	17,4	80,6
20	16,2	81,6	16,2	81,6	17,4	80,6
25	16,2	81,6	16,2	81,6	16,6	81,2

Resultados expressos como média (n=3), kGy = quilo-gray

Os valores de umidade em mel estão diretamente relacionados aos valores do grau brix, sendo obtidos pelo índice de refração da luz, com o auxílio do refratômetro. A umidade é dada calculando-se o índice de refração, levando em consideração a temperatura e utilizando a tabela de Chataway, a qual indica a quantidade de água, e o grau brix, que a quantidade de sólidos solúveis presente no mel em porcentagem (ALMEIDA-MURADIAN e BERA, 2008). A umidade elevada é responsável pela fermentação no mel, que não pode estar acima de 20% (CRANE, 1987; BRASIL, 2000).

A amostra analisada de mel silvestre continha 17% de umidade e, após a radiação, esse valor foi reduzido para 16,60%, com doses de 10 e 15 kGy, e 16,20%, com 20 e 25 kGy, respectivamente.

A radiação gama não alterou o teor de umidade das amostras de mel de laranjeira, que se manteve em 16,20%, tanto na amostra controle, quanto com as demais doses aplicadas.

Nas amostras de mel de eucalipto ocorreu ligeira diminuição, de 17,40% na umidade inicial, para 17,00%, com a aplicação de 10 kGy, e de 16,60% com as doses de 5 e 25 kGy, revelando diminuição uniforme comparada com a amostra do mel silvestre.

Em todas as amostras analisadas o teor de umidade foi o esperado para mel, que mesmo depois de irradiadas apresentaram valores abaixo do limite estabelecido pela legislação. No trabalho de Mateo e Bosh-Reig (1998) o mel silvestre apresentou variação de 14,6 a 16,4%, no mel de *citrus*, de 16,4 a 19,6% e 14,1 a 16,7%, para o mel de eucalipto. Muitos trabalhos mostram variações no teor de umidade do mel estando ligada principalmente à origem botânica e ao clima (CRANE, 1987; BOGDANOV, 2004).

4.1.2 Hidroximetilfurfural

Os resultados obtidos para o HMF estão apresentados na TAB. 5.

TABELA 5 - Resultados das análises de HMF nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	HMF (mg/kg)		
	Silvestre	Laranjeira	Eucalipto
0	12,18 ^a ± 0,01	6,22 ^a ± 0,13	7,32 ^a ± 0,39
5	11,27 ^a ± 0,06	4,81 ^b ± 0,04	5,38 ^b ± 0,26
10	9,92 ^b ± 0,01	3,77 ^c ± 0,01	3,79 ^c ± 0,43
15	9,52 ^c ± 0,03	2,90 ^d ± 0,07	2,69 ^c ± 0,15
20	7,98 ^c ± 0,06	2,33 ^e ± 0,04	2,69 ^c ± 1,79
25	8,03 ^c ± 0,06	2,04 ^f ± 0,04	3,09 ^c ± 0,11

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3) ND = Número de diastase

Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Dentre os parâmetros mais importantes das análises físico-químicas, está o teor de HMF, o qual se encontra presente nos alimentos ricos em carboidratos, água na presença de um ácido, sendo um parâmetro indicador de qualidade do mel (CRANE, 1987; FALLICO *et al.*, 2004). De acordo com a legislação brasileira o mel não pode conter teores elevados de HMF, ficando estabelecido o máximo de 60 mg/kg (BRASIL, 2000). Alguns trabalhos citam que quantidades elevadas de HMF em alimentos podem vir a ser tóxicas (JANZOWSKI *et al.*, 2000; NOZAL *et al.*, 2001, TOSI *et al.*, 2002).

De acordo com a TAB. 5, pode-se observar os resultados obtidos nas análises de HMF em amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto; as quantidades encontradas foram 12,18; 6,22 e 7,32 mg/kg, respectivamente, indicando que essas amostras possuíam quantidades adequadas à legislação. Algumas alterações ocorreram a partir de 5 kGy, apresentando diminuição linear relativamente uniforme. A amostra do mel silvestre teve a menor redução entre os três méis, sendo de 34,08% com a dose de 25 kGy; já nas amostras de méis de laranjeira e eucalipto, observa-se redução de 67,2% e 57,8%, respectivamente. Essa diminuição no teor de HMF também foi observada no trabalho de Podadera (2007), que irradiou amostras de açúcar líquido com doses de 5, 10, 20, 30 e 50 kGy. O teor de HMF também diminuiu nas amostras comerciais irradiadas com 10 kGy, conforme descrito no trabalho de Bera *et al.* (2009). Sendo possível que a molécula de HMF tenha se quebrado com a radiação gama, pois é um composto sensível à radiação ultravioleta (WUNDERLIN, 1998).

Na FIG. 7 mostra-se a diminuição gradativa do teor do HMF em méis de eucalipto, laranjeira e silvestre irradiados com doses entre 0 e 25 kGy .

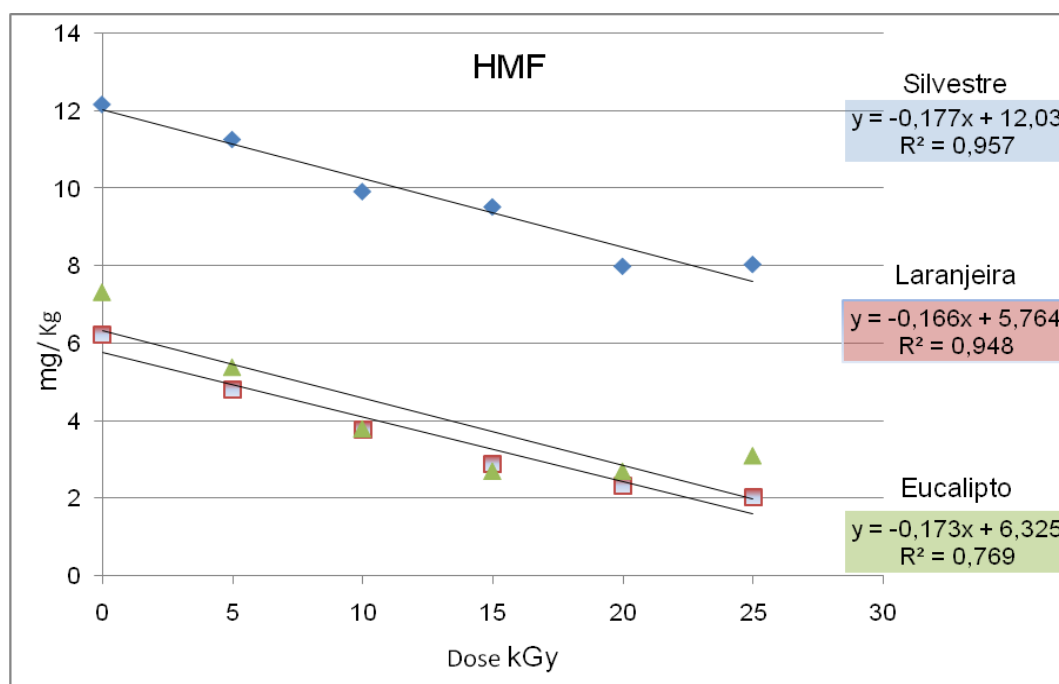


FIGURA 7 – Teor de HMF nas doses de 0 a 25 em méis silvestre, laranjeira e eucalipto.

4.1.3 Atividade diastásica

A atividade diastásica, que também é um indicativo de pureza do mel, apresentou resultados conforme os padrões exigidos pela legislação brasileira para qualidade do mel. Verificou-se que as amostras estudadas estavam dentro das especificações oficiais, uma vez que o valor mínimo de diástase exigido é de 8 ND, quando o teor de HMF é maior que 15 mg/kg, e de 3 ND, quando o teor de HMF for menor que 15 mg/kg. O resultado da atividade diastásica é expresso como volume em mL de solução de amido a 1% hidrolisado pela enzima em 1 g de mel, durante 1 hora. Esse parâmetro é recomendado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (Brasil, 2000).

Os resultados obtidos nas análises de atividade diastásica estão apresentados na TAB. 6.

TABELA 6 - Resultados das análises de atividade diastásica nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Atividade diastásica (ND)		
	Silvestre	Laranjeira	Eucalipto
0	7,44 ^a ± 0,25	3,44 ^a ± 0,15	14,71 ^a ± 0,09
5	6,22 ^b ± 0,05	2,96 ^b ± 0,01	13,62 ^b ± 0,63
10	5,06 ^c ± 0,11	2,82 ^b ± 0,08	13,13 ^c ± 0,19
15	5,53 ^d ± 0,15	3,06 ^b ± 0,34	12,99 ^c ± 0,40
20	5,66 ^d ± 0,03	2,43 ^b ± 0,09	12,25 ^d ± 0,33
25	4,36 ^e ± 0,20	2,45 ^b ± 0,05	11,62 ^d ± 0,28

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3) ND = Número de diastase

Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Na amostra do mel silvestre o teor de diastase foi reduzido em 41,40%; este valor, que era 7,44 ND, passou para 4,36 ND depois de irradiado com 25 kGy. A amostra de mel de laranjeira teve redução de 28,78%, passando de 3,44 ND para 2,45 ND, e a amostra de eucalipto teve menor redução, que foi de 21,01%; o número de diástase era 14,71, com a aplicação de 25 kGy, reduziu-se para 11,62 ND. A diminuição do número de diastase não é um resultado desejável, pois é um indicador de pureza no mel (MIGDAL *et al.*, 2000). Embora tenha ocorrido redução das enzimas nas amostras, com exceção de laranjeira, mantiveram-se acima do limite mínimo permitido para méis com essa concentração de HMF, que foi menor que 15 mg/kg, sendo 3 ND (BRASIL, 2001). Mesmo com a aplicação de 25 kGy de dose, é possível ter ocorrido um efeito destrutivo da radiação sobre a diastase nessas amostras.

A FIG. 8 mostra a diminuição gradativa da atividade diastásica em méis de eucalipto, laranjeira e silvestre irradiados com doses entre 0 e 25 kGy.

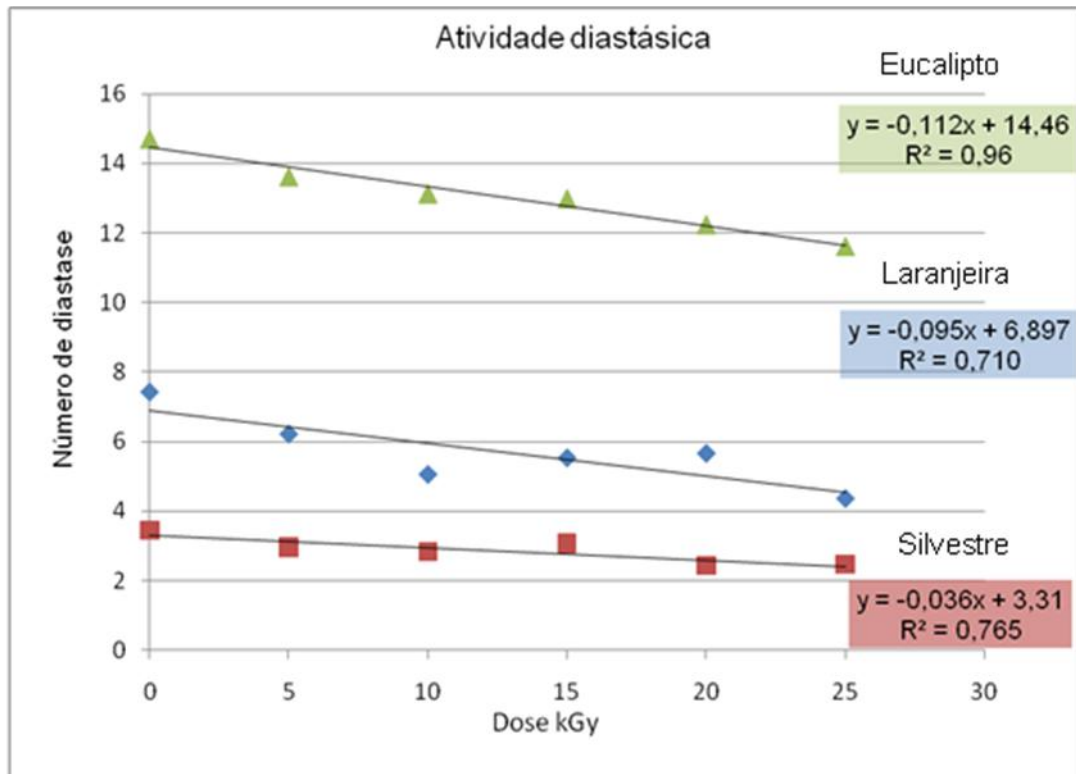


FIGURA 8 – Atividade diastásica em méis de eucalipto, laranjeira e silvestre irradiados com doses de 0 a 25 kGy.

4.1.4 Acidez livre e pH

Os resultados obtidos nos teores de acidez livre e pH estão apresentados na TAB. 7.

Tabela 7: Resultados das análises de acidez livre e pH nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Acidez livre (mEq/Kg)/ pH					
	Silvestre		Laranjeira		Eucalipto	
0	21,32 ^a ± 0,29	4,23 ^a ± 0,01	14,16 ^a ± 0,29	4,18 ^a ± 0,01	16,16 ^a ± 0,29	4,39 ^a ± 0,01
5	21,99 ^a ± 0,50	4,19 ^b ± 0,01	14,49 ^a ± 0,01	4,15 ^b ± 0,01	15,83 ^a ± 0,03	4,38 ^a ± 0,01
10	21,32 ^a ± 0,29	4,21 ^b ± 0,01	14,99 ^b ± 0,01	4,13 ^b ± 0,03	16,99 ^b ± 0,50	4,38 ^a ± 0,03
15	22,16 ^a ± 0,28	4,19 ^b ± 0,02	14,82 ^b ± 0,29	4,10 ^b ± 0,01	17,32 ^b ± 0,29	4,35 ^a ± 0,00
20	22,15 ^a ± 0,29	4,17 ^b ± 0,01	14,99 ^b ± 0,02	4,10 ^b ± 0,02	18,82 ^b ± 0,77	4,29 ^b ± 0,00
25	22,99 ^b ± 0,03	4,17 ^b ± 0,01	19,92 ^c ± 0,03	4,09 ^b ± 0,01	21,06 ^c ± 0,02	4,31 ^b ± 0,01

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-grey (n=3) mEq/Kg miliequivalentes/ quilo. Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes.

Os valores para a acidez livre apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) na amostra do mel silvestre, com a aplicação da dose de 25 kGy, na qual ocorreu aumento de 7,83%, passando de 21,32 para 22,99 mEq/kg. Na amostra do mel de laranja, esse aumento ocorreu a partir da dose de 10 kGy, passando de 14,16 mEq/kg, na amostra controle, para 14,99 mEq/kg teve um aumento de 5,54% e de 40,68%, passando para 19,92% com a dose de 25 kGy.

A amostra de mel de eucalipto teve comportamento parecido, aumentou 5,14%, com dose de 10 kGy, e 30,32%, com a dose de 25 kGy. O teor de acidez livre está relacionado à presença de ácidos orgânicos, especialmente o ácido glucônico, em equilíbrio com suas lactonas ou ésteres, e ainda alguns íons inorgânicos, como fosfatos e sulfatos (TERRAB *et al.*, 2002; OZCAN *et al.*, 2006).

Estes resultados revelam que o teor da acidez livre nessas amostras encontram-se nas concentrações esperadas para o mel puro, mesmo após aplicada a dose de 25 kGy, o mesmo ocorrendo com os resultados de pH, sendo o limite estabelecido pela legislação brasileira TAB. 1.

4.1.5 Minerais e sólidos insolúveis

Os resultados obtidos nas análises de minerais e sólidos Insolúveis estão apresentados na TAB. 8.

Tabela 8 - Resultados das análises de minerais e sólidos insolúveis nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Minerais (%) e sólidos Insolúveis		
	Silvestre	Laranjeira	Eucalipto
0	0,26 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,03
5	0,25 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,36 ± 0,02
10	0,25 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,01
15	0,25 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,36 ± 0,02
20	0,23 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,35 ± 0,21
25	0,23 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,35 ± 0,02

Resultados expressos como média ±desvio padrão kGy = quilo-grey (n=3)

O teor de minerais (cinzas) e de sólidos insolúveis no mel pode ser um indicador de boas práticas de produção, pois méis com alta porcentagem de cinzas podem indicar manipulação inadequada (ALMEIDA-MURADIAN e BERA, 2008). Cinza é o resultado da incineração da matéria orgânica em mufla a 550°C, sendo transformada em CO₂, H₂O e NO₂ (CECCHI, 1999). Os valores obtidos nessas análises para as amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto (TAB. 9) mostraram teor de cinzas e de substâncias solúveis adequado aos parâmetros exigidos e não apresentaram diferenças significativas após a aplicação da radiação gama.

4.1.6 Açúcares redutores e sacarose aparente

No mel, os carboidratos são as substâncias encontradas em maior concentração, cerca de 75% na forma de açúcares redutores (CRANE, 1987; CECCHI, 1999). Os resultados obtidos para os açúcares redutores em mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5, 10, 15, 20 e 25 kGy analisados estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação.

Os resultados obtidos nas análises de açúcares redutores e sacarose aparente estão apresentados na TAB. 9.

Tabela 9 - Resultados das análises de açúcares redutores e sacarose aparente nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Açúcares redutores e sacarose aparente (mg/kg)					
	Silvestre	Laranjeira	Eucalipto			
0	72,31 ^a ± 0,60	6,48 ^a ± 0,65	69,09 ^a ± 0,81	5,90 ^a ± 0,15	71,66 ^a ± 0,51	6,13 ^a ± 0,71
5	69,41 ^a ± 1,24	8,19 ^a ± 2,57	70,73 ^a ± 0,36	5,53 ^a ± 0,51	71,22 ^a ± 0,43	4,72 ^a ± 0,96
10	68,97 ^b ± 0,39	5,31 ^a ± 2,70	69,94 ^b ± 0,58	6,04 ^a ± 0,55	69,96 ^b ± 0,85	8,56 ^b ± 0,21
15	73,98 ^a ± 1,07	4,86 ^a ± 1,35	69,67 ^a ± 0,25	6,22 ^a ± 11,71	69,96 ^b ± 0,55	5,17 ^a ± 0,30
20	72,96 ^a ± 0,65	4,95 ^a ± 0,33	68,96 ^a ± 0,29	5,25 ^a ± 23,38	71,06 ^a ± 0,64	4,48 ^a ± 1,30
25	71,46 ^a ± 0,70	5,64 ^b ± 1,26	70,96 ^a ± 0,37	5,07 ^b ± 6,91	68,89 ^b ± 0,43	8,07 ^a ± 1,14

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-grey (n=3)
Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes.

A amostra de mel silvestre apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) no teor de açúcares redutores após a irradiação, somente com a aplicação da dose de 10 kGy; já no mel de eucalipto essa redução foi com 10, 15 e 25 kGy. O mel de laranjeira não apresentou alteração significativa após o processo de irradiação. Esses valores também estão próximos dos encontrados na literatura para o mel puro, estando entre 53,2 e 80,0% (KOMATSU *et al.*, 2002).

4.1.7 Análises de Lund, Fiehe e Lugol

Os resultados obtidos das análises de Lund, Fiehe e Lugol nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre as doses 0 a 25 kGy estão apresentados na TAB. 10.

TABELA 10 - Resultados das análises de Lund, Fiehe e Lugol nas amostras de mel silvestre, laranjeira e eucalipto entre doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Silvestre			Laranjeira			Eucalipto		
	Lund	Fiehe	Lugol	Lund	Fiehe	Lugol	Lund	Fiehe	Lugol
0	+	-	-	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	-	-	+	-	-
10	+	-	-	+	-	-	+	-	-
15	+	-	-	+	-	-	+	-	-
20	+	-	-	+	-	-	+	-	-
25	+	-	-	+	-	-	+	-	-

kGy = quilo-gray (+) = resultado positivo (-) = resultado negativo

Os testes de Lund, Fiehe e Lugol foram realizados conforme descrito nas normas técnicas do Instituto Adolfo Lutz (2005), sendo Lund positivo quando ocorre precipitado entre 0,6 e 3,0 mL na bureta, quando se trata de mel puro (verdadeiro). Um teste qualitativo para o frescor do mel é o teste de Fiehe; quando apresenta coloração vermelho intenso o resultado é positivo e indica concentração elevada de HMF; portanto, as amostras analisadas não apresentaram coloração, sendo o resultado negativo. A reação de Lugol detecta fraude no mel com glicose comercial; assim, apresentando coloração marrom-avermalhada à azul o resultado é positivo para adulteração. As amostras

analisadas não apresentaram coloração para este teste, sendo resultado negativo.

4.1.8 Proteínas

O mel possui baixo teor de proteínas e a variação nesse valor é devido à origem floral, que pode ser desde 0,2 a 0,99% (PENG e PAN, 1994).

Na TAB. 11 são mostrados os resultados das análises de proteínas nas amostras de méis silvestre, eucalipto e laranjeira nas doses de 0 e 25 kGy.

TABELA 11: Resultados das análises de proteínas para amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Proteínas		
	Silvestre	Eucalipto	Laranjeira
0	0,62 ^a ± 0,06	0,38 ^a ± 0,11	0,47 ^a ± 0,00
5	0,61 ^a ± 0,05	0,58 ^b ± 0,09	0,52 ^a ± 0,04
10	0,58 ^a ± 0,10	0,60 ^b ± 0,12	0,38 ^b ± 0,00
15	0,45 ^a ± 0,06	0,41 ^a ± 0,02	0,35 ^b ± 0,02
20	0,53 ^a ± 0,09	0,53 ^a ± 0,09	0,35 ^a ± 0,13
25	0,44 ^b ± 0,02	0,46 ^a ± 0,02	0,38 ^b ± 0,00

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os teores de proteínas encontrados nos méis com floradas predominantes silvestre, eucalipto e laranjeira se encontram dentro dos valores médios esperados para méis de abelha. Algumas flutuações nesse teor ocorreram após a aplicação da radiação gama, porém sem que tenha ocorrido alteração acentuada.

4.1.9 Atividade de água

A atividade de água, conforme citado anteriormente, é um importante parâmetro de qualidade no controle de leveduras osmotolerantes que podem ser encontrada no mel e o limite de segurança para o desenvolvimento desses é em torno de $a_w = 0,61$ (ZAMORA *et al.*, 2006).

Os resultados da análise de atividade de água para amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy estão apresentados na TAB. 12.

TABELA 12 – Resultado da análise de atividade de água nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose kGy	Atividade de Água (aw)		
	Silvestre	Eucalipto	Laranjeira
0	0,56 ^a ± 0,00	0,53 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00
5	0,56 ^a ± 0,00	0,54 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00
10	0,56 ^a ± 0,00	0,54 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00
15	0,57 ^a ± 0,00	0,54 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00
20	0,57 ^a ± 0,00	0,54 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00
25	0,56 ^a ± 0,00	0,53 ^a ± 0,00	0,50 ^a ± 0,00

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Os resultados das análises de aw entre esses três méis de diferentes espécies florais, de acordo com a TAB. 13, mostraram valores muito próximos, não ocorrendo modificações significativas para esse parâmetro mesmo após o tratamento com radiação gama, estando também em conformidade com os resultados encontrados na literatura para diferentes tipos de méis, entre 0,48 e 0,56 (ABRAMOVIC, *et al.*, 2008)

4.1.10 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é um importante parâmetro físico-químico que auxilia na classificação do mel monofloral e do mel de melato, sendo um bom indicador da origem botânica do mel. Méis florais possuem baixa condutividade elétrica em relação a méis multiflorais e de melato, estando relacionados com os teores de acidez e cinzas (SODRÉ *et al.*, 2007; KASKONIENE *et al.*, 2010).

Os resultados da análise de condutividade elétrica para amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy estão representados na TAB. 13.

TABELA 13 - Resultados das análises de condutividade elétrica nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy.

Amostra Dose kGy	Condutividade elétrica (μS)		
	Silvestre	Eucalipto	Laranjeira
0	682 ^a \pm 4,73	798 ^a \pm 1,00	332 ^a \pm 1,53
5	683 ^a \pm 3,79	806 ^a \pm 3,21	338 ^b \pm 0,58
10	683 ^a \pm 1,15	815 ^b \pm 1,00	343 ^b \pm 0,58
15	675 ^a \pm 4,73	813 ^b \pm 1,00	347 ^b \pm 0,58
20	690 ^a \pm 0,58	825 ^b \pm 1,00	351 ^b \pm 1,53
25	690 ^a \pm 0,58	833 ^b \pm 2,08	356 ^b \pm 0,58

Resultados expressos como média \pm desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3) Microsiemens = μS

Os valores acompanhados por letras diferentes numa mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

De acordo com os dados apresentados na TAB. 13, é possível notar que méis florais realmente possuem condutividade elétrica menor do que os méis silvestres e eucaliptos, reforçando os resultados encontrados por Sodré *et al.* (2007) e por Kaskoniene *et al.* (2010). A aplicação da radiação gama não alterou a condutividade elétrica na amostra de mel silvestre, embora tenha ocorrido aumento significativo nas amostras de méis de eucalipto a partir de 10 kGy e laranjeira a partir de 5 kGy.

4.1.11 Cor

A classificação da cor do mel é realizada de acordo com a escala Pfund (TAB.1), que estabelece uma relação entre milímetros com a cor correspondente (KRELL, 1996). Os resultados da análise de cor para amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy estão apresentados na TAB. 14.

TABELA 14 – Resultado da análise de cor nas amostras de méis de eucalipto, silvestre e laranjeira nas doses de 0 a 25 kGy.

Dose (kGy)	Laranjeira		Silvestre		Eucalipto	
	Pfund mm	Cor	Pfund mm	Cor	Pfund mm	Cor
0	61	Â claro	92	Âmbar	71	Â claro
5	66	Â claro	108	Âmbar	89	Âmbar
10	66	Â claro	108	Âmbar	95	Âmbar
15	78	Â claro	111	Âmbar	101	Âmbar
20	77	Â claro	101	Âmbar	104	Âmbar
25	71	Â claro	108	Âmbar	105	Âmbar

(kGy) quilo gray , Â = Âmbar

Méis provenientes da flor de laranjeira tendem a ser mais claros em comparação com os de flores silvestres e, principalmente, de eucalipto, que é naturalmente mais escuro. De acordo com a TAB. 14, a radiação gama nas doses aplicadas, embora tenha modificado os valores em milímetros da escala Pfund, não alterou a cor dos méis silvestre e laranjeira. A amostra de eucalipto sofreu escurecimento, passando de âmbar claro (71 mm) para âmbar (105 mm) com a dose de 5 kGy.

4.2 Resultados das amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy

4.2.1 Umidade e brix

Muitos fatores estão diretamente relacionados à umidade, como o sabor, a cor, o aroma, a viscosidade a densidade do mel, sendo este um dos parâmetros mais importantes para as análises físico-químicas, a estabilidade e a conservação do produto (CANO *et al.*, 2001; CAVIA *et al.*, 2002; ISENGARD e PRÄGER, 2003). O material sólido presente nas amostras pode variar, dependendo da região, da variedade floral e do tipo de mel e está diretamente relacionado com o teor de umidade do produto (ISENGARD e SCHULTHEIB, 2003). O teor de umidade é um parâmetro importante para auxiliar no controle do produto, especialmente quando se necessita de uma vida de prateleira considerável (ABRAMOVIC *et al.*, 2008).

Na TAB. 15 pode-se observar os resultados de umidade e grau brix nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

TABELA 15 - Resultados das análises de umidade e grau brix nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Umidade (%)		Brix (%)	
	0 kGy	10 kGy	0 kGy	10 kGy
1	17,0	17,0	81,0	81,0
2	18,2	16,6	80,4	81,2
3	19,0	19,0	79,0	79,0
4	17,4	17,4	80,4	80,4
5	17,6	17,6	80,6	80,6
6	17,0	17,0	81,0	81,0
7	17,0	17,0	81,0	81,0

Resultados expressos como média (n=3) kGy = quilo-gray

A amostra 2, o teor de umidade e, conseqüentemente, ao brix, foi a única que teve diminuição de 8,79%, as demais amostras permaneceram com esse teor inalterado após a aplicação de 10 kGy de dose. A maior porcentagem de umidade encontrada entre as amostras comerciais foi de 3, com 19%, e se manteve estável mesmo após irradiada. O teor de umidade do mel não pode exceder 20%, como meio de prevenção da fermentação causada pela ação de microrganismos que se desenvolvem facilmente em caso de umidade elevada (FARIA, 1993; ISENGARD *et al.*, 2001; CAVIA, 2002). ANUPAMA *et al.* (2002) encontraram variação entre 17 e 22,6% de umidade no mel e de 76 a 81,5% de grau brix em méis indianos.

4.2.2 HMF

A indústria que utiliza o mel, tanto puro ou como ingrediente, procura teores baixos de HMF e agregam valor a isso: quanto menor o teor de HMF maior o valor comercial do mel. O HMF funciona como um indicador da qualidade que auxilia na identificação de um produto fresco, quando apresenta-se em baixas

concentrações, ou identifica um produto que tenha sido aquecido, estocado em condições inadequadas ou adulterado com xarope invertido, quando estiver em altas concentrações (WHITE, 1980; STRONG e DUARTE, 1985; VIÑAS *et al.*, 1992; COCO *et al.*, 1996, BATH e SING, 1999; NOZAL *et al.*, 2001; FALLICO *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos nas amostras comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 16.

TABELA 16 - Resultados das análises de HMF nas amostras de méis comerciais com doses 0 e 10 kGy.

Amostra	HMF (mg/kg)	
	0 kGy	10 kGy
1	4,34 ^a ± 0,26	2,99 ^b ± 0,26
2	54,74 ^a ± 0,44	43,62 ^b ± 0,44
3	49,16 ^a ± 1,53	42,94 ^b ± 1,53
4	27,41 ^a ± 0,61	22,21 ^b ± 0,61
5	19,21 ^a ± 0,37	11,75 ^b ± 0,37
6	12,32 ^a ± 1,17	11,47 ^a ± 1,17
7	39,91 ^a ± 0,09	31,13 ^b ± 0,09

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

O teor de HMF é um parâmetro muito importante para auxiliar na avaliação da pureza no mel e mostrou redução efetiva em todas as amostras analisadas. Embora todas as amostras estivessem dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira, essa diminuição no valor de HMF é um fator a ser considerado benéfico para o produto, pois o teor elevado de HMF pode vir a ser tóxico (JANZOWSKI *et al.*, 2000).

Na FIG. 9 são mostrados os resultados obtidos para HMF em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com doses de 10 kGy.

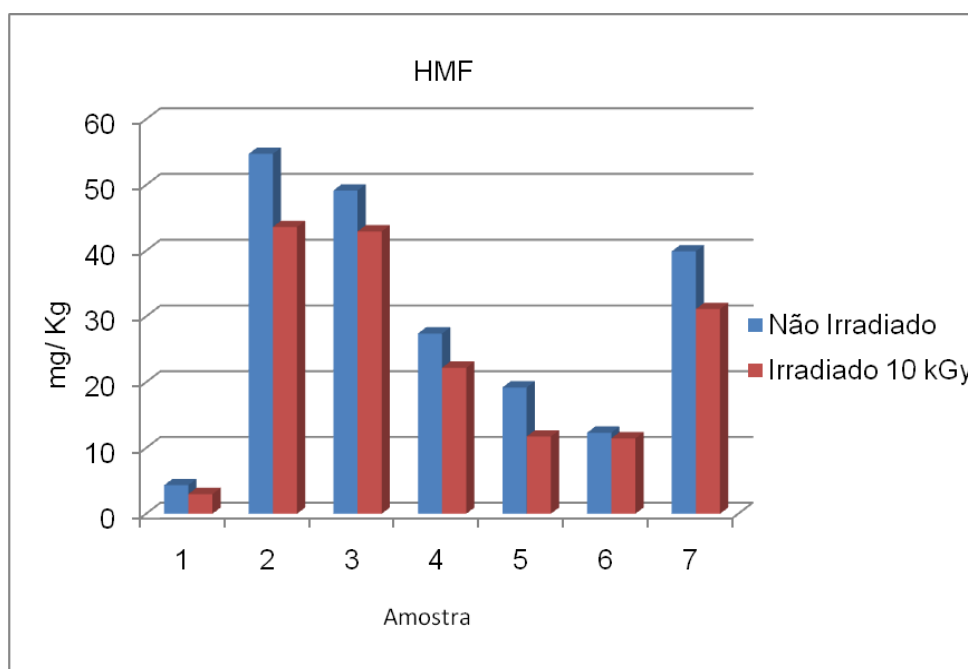


FIGURA 9 – HMF em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com dose de 10 kGy.

As amostras de méis comerciais apresentaram redução significativa no teor de HMF após a aplicação da radiação gama com a dose de 10 kGy. Com base na FIG. 9, é possível verificar a variação da redução do HMF nessas amostras.

4.2.3 Atividade diastásica

Algumas enzimas estão presentes no mel e desempenham importante papel em sua maturação, a análise da atividade diastásica mede o poder enzimático, podendo assim ser indicativo de frescor, superaquecimento, problemas acarretados por armazenamento prolongado ou inadequado deste produto (SANCHO *et al.*, 1992; BOGDANOV *et al.*, 1999).

Os valores médios de atividade diastásica obtidos nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 17.

TABELA 17 - Resultados das análises de atividade diastásica nas amostras de méis comerciais com doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Atividade diastásica (ND)	
	0 kGy	10 kGy
1	13,41 ^a ± 0,48	9,29 ^b ± 0,12
2	2,07 ^a ± 0,04	1,43 ^b ± 0,01
3	4,31 ^a ± 0,06	2,75 ^b ± 0,02
4	3,18 ^a ± 0,27	1,90 ^b ± 0,14
5	9,00 ^a ± 0,22	6,77 ^b ± 0,09
6	9,13 ^a ± 0,10	6,68 ^b ± 0,15
7	2,87 ^a ± 0,15	2,25 ^b ± 0,11

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3) ND = Número de diastase
Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

De acordo com as análises realizadas, o número de diastase apresentou redução significativa em todas as amostras. Na amostra 7 foi obtida a menor redução, sendo de 21,05%; já na amostra 4 ocorreu o maior índice de redução, que foi de 40,25%, indicando que a radiação na dose de 10 kGy possa estar degradando a enzima diastase. O mínimo de atividade diastásica permitido pela legislação brasileira é de 8 na escala de Gothe e 3, se o HMF não exceder 15 mg/kg de mel (BRASIL, 2000). Neste caso, somente as amostras 1, 5 e 6 estariam de acordo com a legislação do mel, tanto antes quanto após a aplicação de 10 kGy de dose.

Na FIG. 10 são mostrados os resultados obtidos para a atividade diastásica em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com dose de 10 kGy.

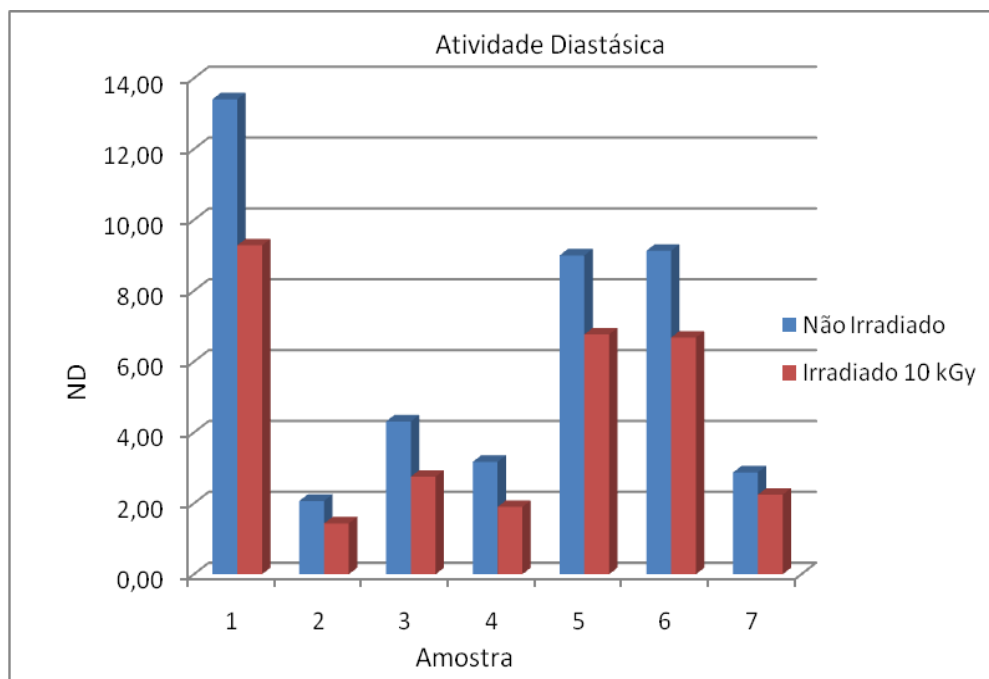


FIGURA 10 – Atividade diastásica em amostras de méis comerciais não irradiados e irradiados com dose de 10 kGy.

As amostras de méis comerciais tiveram o teor de atividade diastásia reduzido significativamente. Na FIG. 10, verifica-se a variação no teor da atividade diastásica entre as amostras de méis comerciais.

4.2.4 Acidez livre e pH

Os ácidos orgânicos contribuem para o odor e o sabor do mel e, dependendo do grau de acidez, podem favorecer a proliferação de microrganismos, reduzindo sua qualidade (MATO *et al.*, 1998). O pH do mel é, em média, 3,9 e o ácido de maior predominância é o glicônico, produzido pela ação da enzima glicose-oxidase, pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas. Outros ácidos encontrados no mel são: fórmico, acético, benzoico, butírico, cítrico, láctico, maleico, málico, oxálico e fenilacético (CRANE, 1987).

Os resultados das análises de acidez livre e pH nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB 18.

TABELA 18 - Resultados das análises de acidez livre pH nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Acidez livre (mEq/kg) por titulometria e pH			
	0 kGy	10 kGy	0 kGy	10 kGy
1	20,62 ^a ±0,28	20,71 ^a ±0,32	4,20 ±0,00	4,20 ±0,00
2	27,13 ^a ± 0,29	28,15 ^b ±0,27	3,90 ±0,00	3,80 ±0,00
3	19,17 ^a ±0,28	18,71 ^a ±0,38	3,90 ±0,00	3,80 ±0,00
4	47,27 ^a ±0,56	43,91 ^b ±0,01	4,10 ±0,00	4,10 ±0,00
5	17,43 ^a ±0,46	17,15 ^a ±0,52	4,10 ±0,00	4,00 ±0,00
6	19,14 ^a ±0,29	19,24 ^a ±0,34	4,00 ±0,00	4,10 ±0,00
7	29,63 ^a ±0,30	33,18 ^b ±0,31	4,20 ±0,00	4,10 ±0,00

Resultados expressos como média (n=3) ± desvio padrão kGy = quilo-gray

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

O teor de acidez livre e o pH presentes no mel não tiveram variação considerável, obtendo valores permitidos pela legislação mesmo após a irradiação. De acordo com a legislação brasileira, deve ser realizada a análise da acidez livre, que é baseada na titulação potenciométrica; o máximo de acidez livre permitida no mel é de 50 miliequivalentes/kg (BRASIL, 2000).

4.2.5 Minerais e sólidos insolúveis

O teor de minerais encontrados em méis é relativamente baixo se comparados a outros alimentos e pode ser variável em relação à origem botânica e à região, entre outros fatores (CRANE, 1987).

Os resultados das análises de minerais e sólidos insolúveis nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB 19.

TABELA 19 - Resultados das análises de minerais e sólidos insolúveis nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Minerais (%) e sólidos insolúveis			
	0 kGy	10 kGy	0 kGy	10 kGy
1	0,35 ^a ±0,05	0,34 ^a ± 0,04	0,01 ±0,00	0,01 ±0,00
2	0,40 ^a ±0,03	0,36 ^a ± 0,10	0,01±0,00	0,02 ±0,00
3	0,39 ^a ±0,04	0,35 ^a ± 0,07	0,01±0,00	0,00 ±0,00
4	0,60 ^a ±0,00	0,50 ^a ± 0,00	0,01±0,00	0,01 ±0,00
5	0,36 ^a ±0,00	0,36 ^a ± 0,01	0,01±0,00	0,01 ±0,00
6	0,24 ^a ±0,00	0,32 ^a ± 0,00	0,02 ±0,00	0,01 ±0,00
7	0,32 ^a ±0,00	0,31 ^a ± 0,00	0,01 ±0,00	0,01 ±0,00

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

A quantidade de cinzas e sólidos insolúveis presentes nas amostras dos méis comerciais não apresentou variação significativa e os valores estão dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira, mesmo após aplicação da radiação gama.

4.2.6 Açúcares redutores e sacarose aparente

Os açúcares redutores são as substâncias encontradas em maiores quantidades no mel, sendo predominantes frutose e glicose. Esses dois açúcares somam entre 85 e 95% dos carboidratos. As concentrações desses açúcares podem variar muito dependendo do tipo de mel, sendo responsáveis também pela viscosidade, higroscopicidade e granulação do mel (CAVIA *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos nas análises de açúcares redutores e sacarose aparente para méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 20.

TABELA 20 - Resultados das análises de açúcares redutores e sacarose aparente nas amostras de méis comerciais com doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Açúcares redutores (mg/kg)		sacarose aparente (mg/kg)	
	0 kGy	10 kGy	0 kGy	10 kGy
1	78,09 ^a ± 0,40	78,76 ^a ± 0,28	3,81 ^a ± 0,73	3,18 ^a ± 0,57
2	78,82 ^a ± 1,02	79,43 ^a ± 0,48	9,44 ^a ± 0,49	2,84 ^b ± 4,41
3	77,36 ^a ± 0,91	72,97 ^b ± 0,88	2,26 ^a ± 0,54	0,86 ^b ± 0,10
4	75,37 ^a ± 0,57	75,54 ^a ± 0,40	5,03 ^a ± 0,07	4,31 ^b ± 0,31
5	78,20 ^a ± 0,40	77,44 ^b ± 0,61	0,54 ^a ± 0,45	1,07 ^b ± 0,67
6	79,90 ^a ± 0,67	76,76 ^b ± 0,67	1,70 ^a ± 0,56	1,13 ^b ± 0,01
7	78,64 ^a ± 0,49	78,22 ^a ± 0,77	2,17 ^a ± 0,67	1,73 ^b ± 0,02

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

Os açúcares redutores foram as substâncias encontradas em maiores quantidades no mel, apresentaram oscilação nos valores entre as amostras controle e irradiadas e não variaram muito após a irradiação.

A sacarose aparente, que também é um indicativo de adulteração, de acordo com a legislação brasileira, mostrou redução significativa em todas as amostras comerciais analisadas após a irradiação, menos a de número 5. Açúcares não-redutores, como a sacarose, servem como parâmetros de pureza do mel, porém, quando detectada em grande quantidade, pode caracterizar adulteração, tanto na alimentação das abelhas, quanto na adição direta de sacarose no mel (MENDES *et al.*, 1998). O limite máximo tolerável no Brasil para sacarose aparente é de 5% para mel de flores e 15% para o mel de melato (BRASIL, 2000). Méis verdes (não maduros) podem conter índices elevados de sacarose (CRANE, 1975; APARNA e RAJALAKSHMI, 1999). Alguns trabalhos mostram que certos tipos de flores podem dar origem a méis com elevados teores de sacarose (SERRA e VENTURA, 1995)

4.2.7 Análises de Lund, Fiehe e Lugol

Os resultados obtidos nas análises de Lund, Fiehe e Lugol aparente estão apresentados na TAB. 21.

TABELA 21: Resultados das análises de Lund, Fiehe e Lugol nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	0 kGy			10 kGy		
	Lund	Fiehe	Lugol	Lund	Fiehe	Lugol
1	+	-	-	+	-	-
2	+	-	-	+	-	-
3	+	-	-	+	-	-
4	+	-	-	+	-	-
5	+	-	-	+	-	-
6	+	-	-	+	-	-
7	+	-	-	+	-	-

kGy = quilo-gray (-) = resultado negativo (+) = resultado positivo

As análises de Lund, Fiehe e Lugol foram aplicadas nas amostras de méis comerciais, conforme descrito nas normas técnicas do Instituto Adolfo Lutz (SAKUMA *et al.*, 2005). O resultado encontrado foi o esperado para mel puro, ocorrendo precipitação entre 0,6 e 3,0 mL em todas as amostras na reação de Lund, que e apresentaram resultado negativo nas reações de Fiehe e Lugol, para o mel não-irradiado e mel irradiado com a dose de 10 kGy.

4.2.8 Proteínas

Na TAB. 22 estão apresentados os resultados das análises de proteínas nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

TABELA 22 - Resultados das análises de proteínas nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Proteínas (%)	
	0 kGy	10 kGy
1	0,102 ^a ± 0,052	0,221 ^b ± 0,094
2	0,634 ^a ± 0,058	0,853 ^b ± 0,054
3	0,664 ^a ± 0,060	0,697 ^a ± 0,057
4	0,579 ^a ± 0,038	0,683 ^b ± 0,051
5	0,615 ^a ± 0,294	0,867 ^b ± 0,075
6	0,664 ^a ± 0,051	0,697 ^a ± 0,059
7	0,754 ^a ± 0,046	0,659 ^b ± 0,048

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

De acordo com os resultados obtidos nas amostras comerciais de mel (TAB. 22), após a aplicação da dose de 10 kGy houve aumento significativo no teor de proteínas, com exceção da amostra número 7, que diminuiu 12,6%.

4.2.9 Condutividade elétrica

Os resultados da análise de condutividade elétrica para amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 23.

TABELA 23 - Resultados das análises de condutividade elétrica nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Condutividade elétrica (μS)	
	0 (kGy)	10 (kGy)
1	0,778 \pm 0,00	0,824 \pm 0,00
2	0,778 \pm 0,00	0,824 \pm 0,00
3	0,224 \pm 0,00	0,235 \pm 0,00
4	0,375 \pm 0,00	0,394 \pm 0,00
5	0,375 \pm 0,00	0,394 \pm 0,00
6	0,290 \pm 0,00	0,281 \pm 0,00
7	1,071 \pm 0,00	1,083 \pm 0,00

Resultados expressos como média \pm desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Os resultados obtidos nas análises de condutividade elétrica apresentados na TAB. 23 indicam variação entre 0,224 e 1,071 nas amostras de méis comerciais. A aplicação de 10 kGy de dose ocasionou pequeno aumento nessas amostras, com exceção da amostra número 6, que sofreu redução de 3,1% na condutividade elétrica.

4.2.10 Atividade de água

Os resultados da análise de atividade de água nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 24.

TABELA 24 – Resultados da análise de atividade de água nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Atividade de água	
	0 (kGy)	10 (kGy)
1	0,59 ^a ±0,002	0,60 ^a ±0,002
2	0,59 ^a ±0,001	0,58 ^a ±0,003
3	0,60 ^a ±0,001	0,58 ^a ±0,008
4	0,55 ^a ±0,007	0,56 ^a ±0,001
5	0,54 ^a ±0,033	0,54 ^a ±0,004
6	0,54 ^a ±0,004	0,54 ^a ±0,001
7	0,54 ^a ±0,003	0,54 ^a ±0,003

Resultados expressos como média ± desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

Valores com letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (p<0,05)

Os resultados na análise da atividade de água para as amostras de méis comerciais, de acordo com a TAB. 24, mostraram valores muito próximos, não ocorrendo modificações significativas para esse parâmetro após o tratamento com a dose de 10 kGy de radiação gama. Esses valores também indicam que a atividade de água está dentro dos limites esperados para o mel.

4.2.11 Cor

A análise de cor no mel vem ganhando destaque devido ao valor agregado, que basicamente aumenta quando o mel possui tonalidades mais claras.

Os resultados obtidos na análise de cor para os méis comerciais com doses 0 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 25.

TABELA 25 – Resultados da análise de cor nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy.

Amostra	Análise de cor			
	0 kGy		10 kGy	
	Pfund mm	Cor	Pfund mm	Cor
1	77	Â. claro	88	Âmbar
2	74	Â. claro	79	Â. Claro
3	88	Âmbar	93	Âmbar
4	80	Â. claro	89	Âmbar
5	62	Â. claro	73	Âmbar
6	45	Â. Ex.claro	76	Âmbar
7	124	Â. escuro	119	Â. escuro

Resultados expressos como média \pm desvio padrão kGy = quilo-gray (n=3)

As amostras comerciais 1, 3, 4 e 5 escureceram após a aplicação da dose de 10 kGy. A amostra 6 teve o maior escurecimento. Nas 20 amostras de méis analisadas por Finola *et al.* (2007), 27% eram branco água, 30% extrabranco, 27% branco, 13% âmbar claro e 3% âmbar escuro. A cor do mel depende de vários fatores, dentre eles origem botânica e conteúdo mineral; méis claros têm pouco teor de cinzas (CRANE, 1987; FINOLA *et al.*, 2007).

4.3 Resultados das amostras de méis comerciais por FT-IR ATR com doses 0 e 10 kGy.

A espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR), que se constitui em método espectroscópico vibracional (infravermelho próximo ou médio), em combinação com a análise estatística multivariada de dados, se mostrou uma técnica rápida, não destrutiva, econômica, com elevado nível de confiança e bem estabelecida para a análise quantitativa de alimentos, inclusive a de mel. Este método pode ser utilizado como uma técnica óptica sensível para se obter “impressões digitais bioquímicas” das amostras, de modo rápido e com menores riscos para produzir artefatos, se comparada a outras técnicas, constituindo-se como uma metodologia válida para a caracterização qualitativa do mel (RUOFF *et al.*, 2006; BERTELLI *et al.*, 2007).

Os valores obtidos nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy por FT-IR ATR foram próximos ao dos obtidos nas análises físico-químicas. A umidade teve variação de 16,6 a 19,5, entre as amostras de mel e mel irradiado. Pequena elevação no teor de acidez pode ser notada entre as amostras controle e irradiadas com 10 kGy. O pH se manteve estável, próximo de 4,0 com pequenas oscilações. A condutividade elétrica apresentou variação não uniforme entre essas amostras, mas dentro do esperado para o mel, entre 0,356 e 0,665 μS .

A espectrometria de infravermelho próximo (NIR) foi aplicada com sucesso no modo de transmitância e transreflectância para a análise quantitativa de frutose, glicose, sacarose e teor de umidade em diferentes amostras de mel (RUOFF *et al.*, 2007). Porém, a espectroscopia de infravermelho médio (MIR) fornece bandas de absorção mais específicas e distintas que a espectroscopia de NIR (RUOFF *et al.*, 2006).

Ruoff *et al.* (2007) utilizaram a FT-NIR associada com a regressão PLS para a calibração com a finalidade de avaliar quantitativamente diversos analitos de mel suíço de diferentes origens botânicas, comparando os resultados obtidos pelos métodos de referência com o FT-NIR. Obtiveram resultados com acurácia satisfatória para a predição do teor de umidade, glicose, frutose, sacarose, monossacarídeos totais, razão frutose/glicose e razão glicose/umidade.

Na TAB. 26 pode-se observar os resultados das análises de frutose, glicose, sacarose, trealose, melezitose, maltose, isomaltose, erlose e turanose nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy por FT-IR ATR.

Tabela 26: Resultados das análises de frutose, glicose, sacarose, trealose, melezitose, maltose, melezitose, maltose, isomaltose, erlose e turanose nas amostras de méis comerciais entre doses de 0 e 10 kGy por FT-IR.

Açúcar mg/Kg	frutose		glicose		sacarose		trealose		melezitose		maltose		isomaltose		erlose		turanose	
	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k	0k	10k
1	42,92	48,94	39,81	43,94	-	-	0,97	0,78	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	-
2	52,95	38,77	55,82	32,97	-	-	-	-	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	0,78
3	38,99	39,46	30,42	30,42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,66	0,66
4	40,56	39,06	37,73	33,50	-	0,01	-	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-	0,24
5	36,88	37,91	28,80	28,34	-	-	0,69	0,40	-	-	0,49	0,23	0,51	0,36	0,51	0,54	1,76	1,71
6	37,63	40,06	31,07	22,81	-	-	0,48	0,71	0,09	-	-	0,84	0,21	0,48	0,02	0,25	1,63	2,04
7	37,56	36,82	28,60	29,35	-	-	0,25	0,31	0,16	0,19	1,26	1,34	0,49	0,53	0,12	0,12	1,79	1,82
Valores médios (k)kGy																		

Os resultados obtidos nas análises para frutose, glicose, sacarose, trealose, melezitose, maltose, isomaltose, erlose e turanose nas amostras de méis comerciais nas doses 0 e 10 kGy por FT-IR ATR apresentados na TAB 26 apontam poucas diferenças no teor de açúcares dessas amostras. Essas análises indicaram teor de frutose e glicose próximos do esperado, ocorrendo pequenas flutuações nos valores após a aplicação da radiação gama com a dose de 10 kGy. A sacarose não foi detectada nessas amostras. Na amostra 3 foi detectada somente a turanose, com 0,66 mg/kg, que não sofreu alteração após a radiação. Todos os açúcares analisados, com exceção da sacarose, foram detectados na amostra 7, sendo observadas pequenas flutuações nos valores após a aplicação da radiação gama. O mel possui variação muito grande no teor de açúcares e muitos deles podem estar ou não presentes na amostra.

4.4 Resultados das análises microbiológicas nas amostras de méis comerciais irradiadas nas doses 0 a 10 kGy

4.4.1 *Escherichia coli*

O mel possui certa atividade antimicrobiana, em razão de suas características de osmolaridade, acidez, geração enzimática de peróxido de hidrogênio via glicose oxidase (MUNDO *et al.*, 2004) e demais propriedades já citadas. Em condições normais, o mel pode conter pequenas quantidades de fungos, leveduras e esporos de bactérias, mas formas vegetativas geralmente não são encontradas (SNOWDON e CLIVER, 1996). Entretanto, se as bactérias forem introduzidas no mel pode ocorrer desenvolvimento microbiano (MUNDO *et al.*, 2004) .

Os resultados obtidos em amostras de mel não irradiado com inoculação de *Echerichia coli* estão apresentados na TAB. 27, quanto às amostras de mel irradiadas a 5 e 10 kGy com inoculação de *Escherichia coli*, estão apresentados nas TAB. 27 e 28.

TABELA 27 – Resultados da contagem de *Escherichia coli* inoculada em amostras de mel não irradiado (0 kGy).

Aeróbios Totais (<i>E.coli</i>) – não irradiado (Dose 0 kGy)					
Amostra 1					
Diluição	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Placas	INC / INC / INC	136 / 150 / 164	21 / 35 / 49	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	150	35	0	0
Resultado: 2,5 X10⁴ UFC/ml					
Amostra 2					
Placas	INC / INC / INC	82 / 101 / 117	30 / 30 / 30	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	100	30	0	0
Resultado: 2,0 X10⁴ UFC/ml					
Amostra 3					
Placas	INC / INC / INC	57 / 54 / 66	8 / 12 / 16	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	59	12	0	0
Resultado: 8,9 X10³ UFC/ml					

n=3

Conforme os dados obtidos na contagem de *E. coli* (TAB. 27) após a inoculação, verificou-se desenvolvimento microbiano elevado nas amostras de mel analisadas.

TABELA 28 – Resultados da contagem de *Escherichia coli* inoculada em amostras de mel irradiado nas doses de 5 e 10 kGy.

Contagem de <i>Escherichia coli</i> (Dose kGy)		
Amostra	5	10
1	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
2	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Resultado: < 10 UFC/ml		

n=3

A aplicação da radiação gama, já na dose de 5 kGy, foi suficiente para eliminar a *E. coli* das amostras de mel.

Na FIG. 11 estão apresentados os resultados da contagem do *E. coli* inoculado nas amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy.

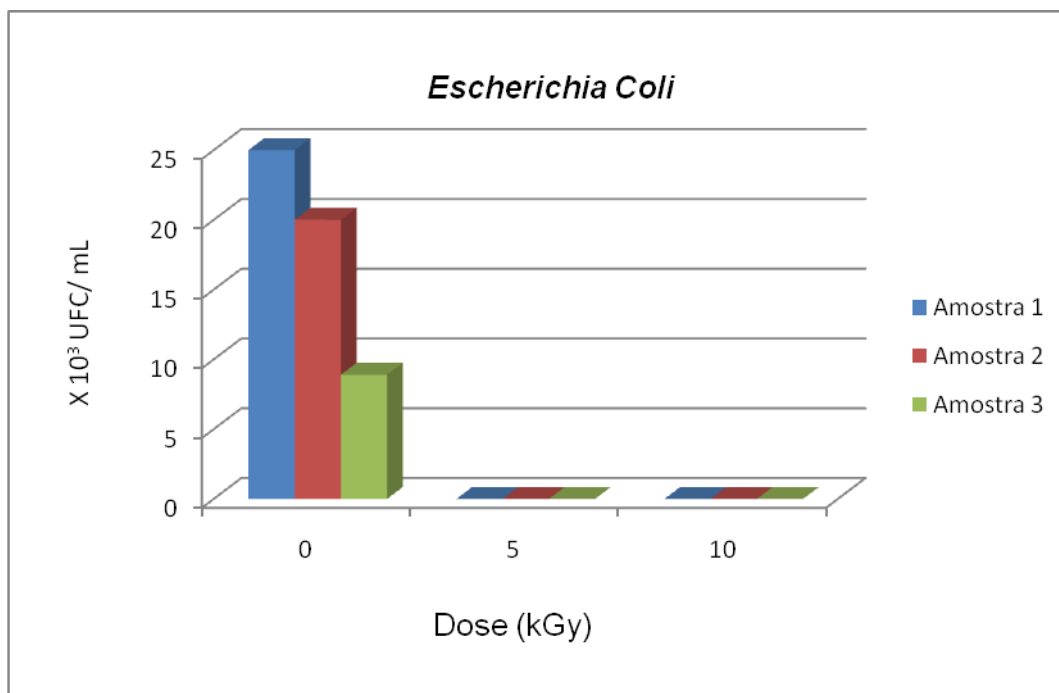


FIGURA 11 – Resultados da contagem de *Escherichia coli*, em amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy.

Com base nos resultados mostrados na FIG. 11 observou-se redução da *E. coli* no mel, obtendo redução efetiva em 100%, conseqüentemente, o mesmo ocorreu com a dose de 10 kGy.

4.4.2 *Aspergillus niger*

Existem poucos trabalhos realizados em relação aos bolores e leveduras no mel, porém Denardi *et al.* (2005) encontraram em 1,67% das amostras analisadas a contagem > 100 UFC/g, com atividade de água > 0,61, mas 98,33% apresentaram contagem de bolores e leveduras < 15 UFC/g, também com atividade de água > 0,61. Nesse mesmo trabalho citam dois estudos que relatam a presença do gênero *Aspergillus spp* e *Penicillium spp* na concentração de $5,0 \times 10^3$ UFC/g (em Recife) e de $0,5$ a $1,4 \times 10^2$ UFC/g (em São José do Rio Preto).

Os resultados obtidos para mel não irradiado e mel irradiado nas doses de 5 e 10 kGy com *Aspergillus niger* inoculado estão apresentados nas TAB. 29, 30 e 31.

TABELA 29 – Resultados das amostras de mel não irradiado com *Aspergillus niger* inoculado.

Aeróbios Totais (<i>A. niger</i>) – não irradiado					
Amostra 1					
Diluição	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Placas	INC / INC / INC	20 / 22 / 24	3 / 5 / 7	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	22	5	0	0
Resultado: 3,6 X 10³ UFC/ml					
Amostra 2					
Placas	100 / 140 / 180	26 / 32 / 37	2 / 2 / 2	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	140	31,6	2	0	0
Resultado: 2,2 X 10³ UFC/ml					
Amostra 3					
Placas	INC / INC / INC	118 / 112 / 138	14 / 20 / 28	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	122,6	20,6	0	0
Resultado: 1,6 X 10⁴ UFC/ml					

De acordo com a literatura citada anteriormente, com a carga microbiana encontrada no mel, após a inoculação, verificou-se elevada concentração do *A. niger* nas amostras analisadas. Assim sendo com os dados obtidos nas análises microbiológicas, a contagem de *A. niger* apresentou carga microbiana elevada após a inoculação da cepa. O *A. niger* pode ser um indicador de contaminação do mel por bolores e leveduras, provenientes do ambiente ou de práticas inadequadas de produção (OLEMPSKA-BEER, 2008).

TABELA 30 – Resultados da contagem de *Aspergillus niger* em amostras de mel irradiado com dose de 5 kGy.

Aeróbios Totais (<i>A. niger</i>) - Dose 5 kGy					
Amostra 1					
Diluição	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Placas	63/ 68 / 82	12/ 17 / 22	1 / 2/ 3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	63,9	17	2	0	0
Resultado: 1,4 X 10³ UFC/ml					
Amostra 2					
Placas	45/ 60 / 61	10/ 20 / 21	2 / 3/ 4	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	55,3	17	3	0	0
Resultado: 1,4 X 10³ UFC/ml					
Amostra 3					
Placas	111/ 112 / 138	18/ 21 / 33	1 / 1/ 4	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	120,3	24	2	0	0
Resultado: 1,4 X 10³ UFC/ml					

O *A. niger* apresentou certa resistência na dose de 5 kGy de dose aplicada nas amostras de mel, mas foi reduzido significativamente em comparação com a contagem inicial.

TABELA 31 – Resultados da contagem de *Aspergillus niger* em amostras de mel irradiado com doses de 10 kGy.

Aeróbios Totais (<i>A. niger</i>)	
Amostra	Dose 10 kGy
1	0 / 0 / 0
2	0 / 0 / 0
3	0 / 0 / 0
Resultado: < 10 UFC/ml	

Após a aplicação da dose de 5 kGy no mel inoculado, observou-se redução em 80,74% na contagem do *A. niger*, passando da média entre as amostras, de 7,27 X 10³ para 1,4 X 10³ UFC/mL, já com a aplicação de uma dose de 10 kGy atingiu o limite de detecção < 10 UFC/mL para este microrganismo.

Na FIG. 12 estão apresentados os resultados da contagem do *A. niger* inoculado nas amostras de mel não irradiado e mel irradiado nas doses de 5 e 10 kGy.

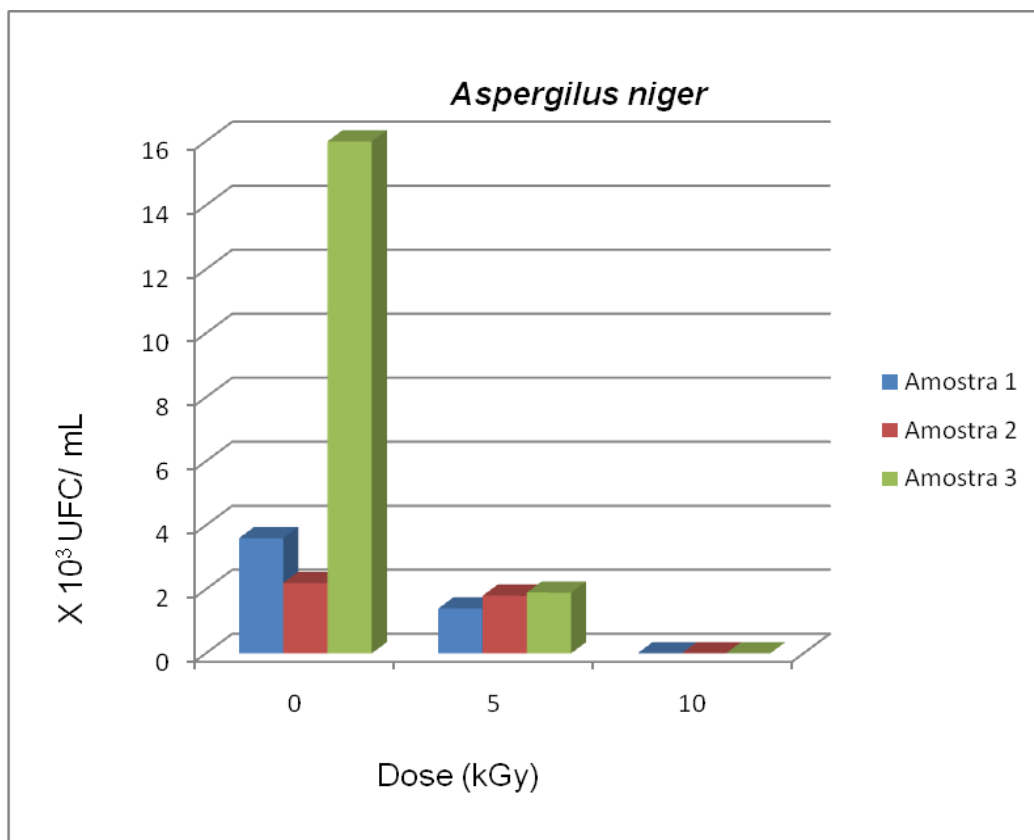


Figura 12 – Resultados da contagem de *Aspergillus niger*, em amostras de mel não irradiado e irradiado com doses de 5 e 10 kGy

Com base nos resultados mostrados na FIG. 12 com a aplicação da dose de 5 kGy observou-se redução do *A. niger* nas amostras analisadas de mel, obtendo redução em 100%, com a dose de 10 kGy. No trabalho de Matsuda (2002) observaram-se resultados semelhantes em própolis após a irradiação com a dose de 10 kGy, enquanto os valores para bolores e leveduras atingiram < 10 UFC/g.

4.4.3 *Clostridium sporogeneses*

Como mencionado anteriormente, o mel possui pouca concentração de microrganismos devido à baixa umidade e à alta concentração de açúcares (HILLEGAS e DEMIRCI, 2003). Porém, se houver desequilíbrio nessa composição como, por exemplo, o excesso de umidade, isso pode fazer com que alguns microrganismos esporulem, ocasionando a fermentação e, conseqüentemente, o aumento da carga microbiana (HILLEGAS e DEMIRCI, 2003).

Os resultados da contagem de *Clostridium sporogenes* estão apresentados nas TAB 32, 33 e 34.

TABELA 32 – Resultados da contagem de *Clostridium sporogenes*, em amostras de mel não irradiado.

Anaeróbios (<i>C. sporogenes</i>) – não irradiado (0 kGy)					
Amostra 1					
Diluição	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Placas	INC / INC / INC	35/ 39 / 42	4 / 7/ 10	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	39	7	0	0
Resultado: 5,4 X 10³ UFC/ml					
Amostra 2					
Placas	INC / INC / INC	159/ 196 / 227	10 / 10/ 10	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	194	10	0	0
Resultado: 1,5 X 10⁴ UFC/ml					
Amostra 3					
Placas	INC / INC / INC	24/ 23 / 28	1 / 2/ 3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	INC	25	2	0	0
Resultado: 2,3 X 10³ UFC/ml					

As contagens iniciais realizadas nas amostras de méis mostraram desenvolvimento elevado, após a inoculação com *C. sporogenes*.

TABELA 33 – Resultados da contagem de *Clostridium sporogenes*, em amostras de mel irradiado com dose de 5 kGy.

Anaeróbios (<i>C. sporogenes</i>) Dose 5 kGy					
Amostra 1					
Diluição	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Placas	13 / 15 / 54	2 / 3 / 3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	27,3	2,6	0	0	0
Resultado: $2,7 \times 10^2$ UFC/ml					
Amostra 2					
Placas	0 / 11 / 18	1 / 2 / 3	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	14,5	2	0	0	0
Resultado: $1,7 \times 10^2$ UFC/ml					
Amostra 3					
Placas	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
Média	0	0	0	0	0
Resultado: > 10 UFC/ml					

Após a aplicação de 5 kGy nas amostras de méis inoculadas com *C. sporogenes* houve redução significativa nas amostras 1 e 2, já na amostra 3 ocorreu redução significativa, atingindo o limite de detecção deste microrganismo no produto.

TABELA 34 – Resultados da contagem de *Clostridium sporogenes*, em amostras de mel irradiado com dose de 10 kGy.

Anaeróbios (<i>C. sporogenes</i>)	
Amostra	Dose 10 kGy
1	0 / 0 / 0
2	0 / 0 / 0
3	0 / 0 / 0
Resultado: < 10 UFC/ml	

Na FIG. 13 são mostrados os resultados da contagem do *C. sporogenes* inoculado nas amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy.

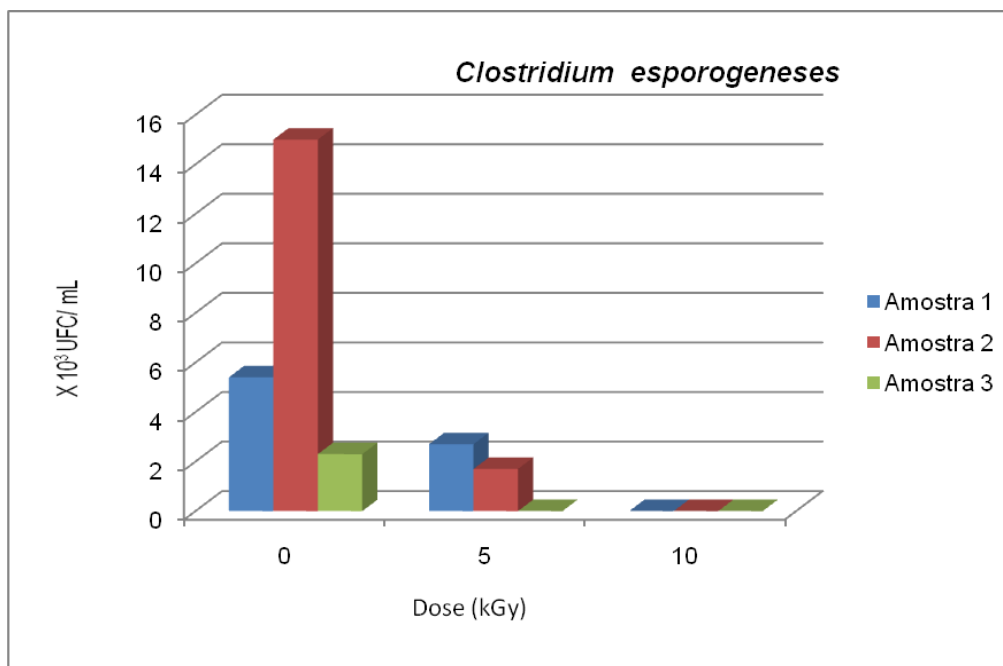


Figura 13 – Resultados da contagem de *Clostridium sporogeneses*, em amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5 e 10 kGy

A aplicação da radiação gama na dose de 10 kGy promoveu efetiva redução na carga microbiana das amostras de méis, que foram contaminados com o *C. sporogeneses*.

4.4.4 *Paenibacillus larvae*

Os esporos do *P. larvae* são responsáveis pela infecção tanto da larva quanto da abelha, e são resistentes a temperaturas elevadas e agentes químicos. No trabalho de Almeida *et al.* (2006) foram testadas algumas doses de radiação gama (5, 7.5, 10, 12,5 e 15 kGy) em mel contaminado com esporos do *P. larvae*, indicando uma possível inativação desse microrganismo com doses a partir de 5 kGy. Redução em 100% só seria possível com doses acima de 10, em torno de 15 e 25 kGy.

Os resultados da contagem de *Paenibacillus larvae* inoculado em amostras de mel não irradiado e mel irradiado nas doses de 5 e 10 kGy estão apresentados na TAB. 35.

TABELA 35 – Resultados da contagem de *Paenibacillus larvae* em amostras de mel não irradiado e mel irradiado nas doses 5 e 10 kGy.

Amostra	Contagem de <i>Paenibacillus larvae</i> UFC/g		
	0 kGy	5 kGy	10 kGy
1	360.000	140.000	350
2	380.000	130.000	230
3	330.000	110.000	130

As amostras de méis contaminadas com esporos do *P. larvae* sofreram redução significativa de aproximadamente 60% com a aplicação da dose de 5 kGy. A aplicação da dose de 10 kGy nessas amostras quase levou a sua redução total, restando apenas 237 UFC/g.

Na FIG. 14 são mostrados os resultados da contagem do *Paenibacillus larvae* inoculado nas amostras de mel não irradiado e de mel irradiado nas doses 5 e 10 kGy.

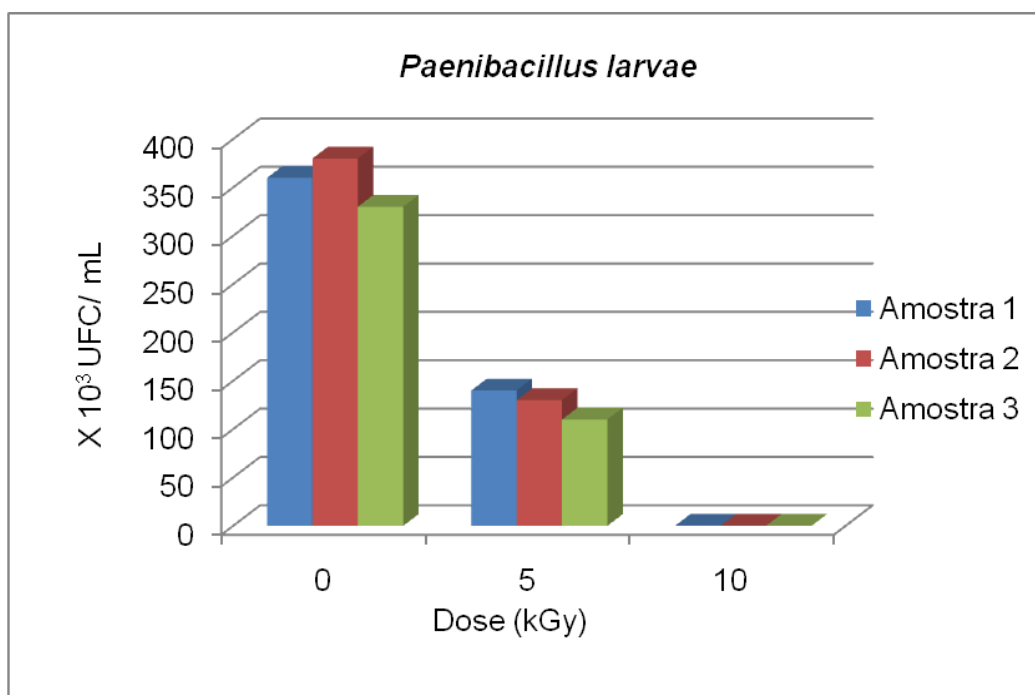


FIGURA 14 – Resultados da contagem das amostras de mel não irradiado e mel irradiado nas doses 5 e 10 kGy contaminadas com *Paenibacillus larvae*

A radiação gama mostrou eficiência muito significativa na redução dos esporos do *P. larvae* com doses a partir de 5 kGy; e mesmo com a aplicação de 10 kGy ainda restaram algumas unidades formadoras de colônias, indicando ser necessária dose ainda maior para que ocorra a redução em 100% deste microrganismo no mel.

4.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada no mel dividido em lotes: controle e irradiado com doses de 5, 10 e 15 kGy, respectivamente. Foi aplicado o teste triangular a 30 provadores, o qual detecta pequenas diferenças entre amostras. Foram apresentadas três amostras codificadas, sendo duas iguais e uma diferente, cabendo ao julgador identificar a amostra diferente. A interpretação é feita com base no total de julgamento *versus* o número de julgamentos corretos. O número de julgamentos incorretos foi superior ao número de julgamentos corretos. Nesse caso, a análise sensorial realizada nas amostras de mel não irradiado e mel irradiado com doses de 5, 10 e 15 kGy apontou não haver diferença significativa (5%) entre as amostras controle e irradiadas.

5 CONCLUSÕES

- A radiação gama teve influência mínima no teor de umidade tanto nas amostras analisadas de méis silvestre, laranjeira e eucalipto, quanto nas comerciais.
- Ocorreu diminuição significativa no teor de HMF a partir de 5 kGy e a redução manteve-se linear com as doses de 10, 15, 20 e 25 kGy nas amostras de méis silvestre, laranjeira e eucalipto. Essa redução também ocorreu nas amostras de méis comerciais irradiadas com 10 kGy.
- A atividade enzimática diminuiu em todas as amostras analisadas de mel irradiadas com radiação gama.
- Os valores para a acidez livre apresentaram aumento significativo nas amostras de méis analisadas, principalmente com a dose de 25 kGy.
- Os teores de cinzas e de sólidos insolúveis no mel não apresentaram diferenças significativas após a aplicação da radiação gama.
- A radiação gama não provocou alterações nas concentrações de açúcares redutores na amostra do mel de laranjeira.
- As amostras comerciais sofreram redução significativa no teor da sacarose aparente.
- Em relação às análises qualitativas de Lund, Fiehe e Lugol mostraram não haver alterações no mel após aplicação da radiação gama.
- As análises de aw revelaram não haver modificações significativas nas amostras de méis após a irradiação.
- A aplicação da radiação gama não alterou significativamente a condutividade elétrica na amostra de mel silvestre.
- A radiação gama nas doses 5 e 10 kGy apresentaram pequenas modificações nos valores (em milímetros) da escala Pfund, alterando em algumas amostras a cor dos méis analisados.
- A técnica de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier mostrou-se uma boa opção para análise de mel e de mel irradiado com radiação gama.

- As análises microbiológicas revelaram que a dose de 5 kGy é suficiente para reduzir significativamente a ação da *E. coli* no mel, mas para *A. niger* e *C. sporogenes* são necessárias doses de 10 kGy para alcançar os limites toleráveis, e para o *P. larvae* se faz necessária aplicação de doses superiores a 10 kGy para se atingir o limite de detecção (<10 UFC). As amostras foram contaminadas artificialmente e, portanto, o bioburden de origem era alto, o que não necessariamente representa a situação real das amostras de méis.
- A análise sensorial realizada nas amostras de mel e de mel irradiado nas doses 5, 10 e 15 kGy apontou não haver diferença significativa (5%) entre as amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVIC, H.; JAMNIK, M.; BURKAN, L. KAC, M. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**. Amsterdam. v.19, p.1086-1090, 2008.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; BERA, A. **Manual de Controle de Qualidade do Mel**. São Paulo: Apacame, 2008. 32p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; PENTEADO, M.D.V.C. **Vigilância Sanitária: tópicos sobre Legislação e análise de alimentos**. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan, 2007. 203p.

ALMEIDA-MURADIAN, L.B. **Qualidade dos produtos apícolas e otimização quimiométrica dos métodos de análise do mel por espectroscopia no infravermelho (FT-IR ATR)**. São Paulo, 2009. 120p. Tese de Livre docência – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ALMEIDA, T.C.A.; HOUGH, G., DAMÁSIO, M.H., SILVA, A.A.P. **Avanços em análise sensorial**. São Paulo: Livraria e editora Varela, 1999, 286p.

ALMEIDA, W. M.; VITAL, H.; SCHUNCH, D. M. T.; CARVALHO, R. R.; MIRANDA, Z. B. Radiossensibilidade de esporos de *Paenibacillus larvae*. subsp. *Larvae* em mel. **Rev. Bras. Ciên. Vet.**, v.13, n.2, p.116-120, 2006.

ANUPAMA, D.; BHAT, K.K.; SAPNA, V.K. Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. **Food Res. Int.**, v.36, n.2, p.183-191, 2002.

APARNA, A.R.; RAJALAKSHMI, D. Honey: its characteristics, sensory aspects, and applications. **Food Rev. Int.**, v.15, n.4, p.455-471, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE MEL. **ABEMEL**. Estatísticas. Disponível em: <<http://www.abemel.com.br/estatisticas.htm>>. Acesso em 03 março 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12806**: Análise sensorial dos alimentos e bebidas. Terminologia. Rio de Janeiro: ABNT, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12995**: Teste triangular em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro, 1993a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15585**: Apicultura sistema de produção no campo. Rio de Janeiro: ABNT, 2008. 8p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: AOAC, 1990. 500p.

AUSTIN, J.W. Detection of *Clostridium botulinum* in Honey and Syrups. **Poly. Public**. Canada, p. 1-5, 1998. Disponível em: <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/volume_3/e_Mflp50e01.html>. Acesso em 25/07/2005.

BARHATE, R.S.; SUBRAMANIAN, R.; NANDINI, K.E.; HEBBER, H.U. Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes. **J. Food Eng.**, Oxford, v.60, n.1, p.1-6, 2003.

BATH, P.K.; SINGH, N. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatu* honey. **Food Chem.**, Amsterdam, v.67, p.389-387, 1999.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Mel com Própolis: considerações sobre sobre a composição e a rotulagem. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p.117-121, 2005.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do Estado de São Paulo. **Cien. Technol. Alim.**, v.27, n.1, p.787-792, 2007.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SABATO. Effect of gamma radiation on honey quality control. **Rad. Phys. Chem.**, n.78, 583-584, 2009.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SABATO. Study of some physicochemical and rheological properties of irradiated honey. **Nukleonika**. Warszawa, Poland. v.53, Sup.2, p.85-87, 2008.

BERA, A. **Composição físico-química e nutricional do mel adicionado com própolis**. São Paulo, 2004. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A.G.; LOLLI, M.; GRILLENZONI, F. Classification of Italian honeys by mid-infrared diffuse reflectance spectroscopy (DRIFTS). **Food Chem.**, v.101, n.4, p.787-792, 2007.

BOGDANOV, S. Honey quality and international regulatory standards: review by International Honey Commission. **Bee World**, Gerrard Cross, v.80, n.2. p.61-69, 1999.

BOGDANOV, S.; MARTIN, P.; LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European Honey Commission. **Apidologie**, Les Ulis, suppl., p.59, 1997.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L.P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review. **Apidologie**, Les Ulis, v35, p.s4-s17, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. **Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003**. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=285>>. Acesso em 03 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. **Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/in_11_2000.htm>. Acesso em: 22 abr. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria **n.248, de 30 de dezembro de 1998**. Aprova as metodologias para a pesquisa de *Bacillus larvae* em mel. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 21/07/ 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.21, de 26 de dezembro de 2001^a**. Regulamentos técnico para irradiação de alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2101rdc.htm>>. Acesso em: 21/07/ 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Alimentos Legislação específica da área por assunto. Rotulagem de Alimentos. **Resolução RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001^b**. Regulamentos técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 21/07/ 2005.

CAMPOS, M.G.R. Contribuição para o estudo de mel, pólen, geléia real e própolis. **Bol. Fac. Farm. Coimbra**, Coimbra, v.11, n.2, p.17-47, 1987.

CANO, C.B. **Caracterização dos méis monoflorais de eucalipto e laranja do Estado de São Paulo pela análise polínica e físico-química.** São Paulo, 2002. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CANO, C.B.; FELSNER, M.L.; MATOS, J.R.; BRUNS, R.E.; WHATANABES, H.M.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Comparison of methods for determining moisture content of citrus and Eucalyptus Brazilian honeys by refractometry. **J. Food Compos. Anal.**, Sidcup, v.14, p.101-109, 2001.

CANO, C.B.; ZAMBONI, C.Q.; ALVES, H.I.; SPITERI, N.; ATUI, M.B.; SANTOS, M.C.; JORGE, L.I.F.; PEREIRA, U.; RODRIGUES, R.M.M. Mel: fraudes e condições sanitárias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.52, p.1-4, 1992.

CAVIA, M.M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; GÓMEZ-ALONSO, E.; MONTES-PÉREZ, M.J.; HUIDOBRO, J.F.; SANCHO, M.T. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. **Food Chem.**, Amsterdam, v.78, p.157-161, 2002.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** Campinas, Ed. da Unicamp, 1999, 212p.

COCO, F.; VALENTINI, C.; NOVELLI, V.; CECCON, L. High-performance liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in honey. **J. Chromatogr. A**, Amsterdam, v.749, p.95-102, 1996.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex standards for sugars (honey).** Rome: FAO, 1989. 21p.

CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE APICULTURA. Programa nacional de georreferenciamento, 2007. Disponível em: <<http://www.brasilapicola.com.br>>. Acesso em 12 março 2009.

COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. São Paulo: Edgard Blücher, 1977, 262p.

COZEN, J.P. **Multivariate calibration**. S.l.: Bruker optik GmbH, 2006. 116p.

CRANE, E. **Honey**. London: Morrison and Gibb, 1975. 608p.

CRANE, E. **O Livro do mel**. 2.ed. São Paulo. Livraria Nobel, 1987. 226p.

CRAWFORD, Y.J.; MURARO, E.A.; OLSON, D.G.; SHENOY, K. Use of high hydrostatic pressure and irradiation to eliminate *Clostridium sporogeneses* spores in chicken breast. **J. food prot.** v. 59, p. 711-715, 1996.

CRAWFORD, L.M.; RUFF, E.H. A review of the safety of cold pasteurization through irradiation. **Food control**, v.7, n.2, p.87-97, 1996.

CRIAÇÃO COMUNICAÇÕES. Mel tem enorme potencial. **Rev. Rur.**, São Paulo, n. 74, p. 1-3, 2004. <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2004/Artigos/rev74_mel.htm> Acesso em: 03/08/2005.

DENARDI, C.A.S.; NISHIMOTO, E. J.; BALIAN, S. C.; TELLES, E. O. Avaliação de atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo – SP, BRASIL. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 64, n.2, p. 219-222, 2005.

DUTCOSKY, S.D.; **Análise Sensorial de Alimentos**. Curitiba, PR, Editora Champagnat, 1996.

EBRAHIMI, A.; LOTFALIAN, Sh. Isolation and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and coagulase positive *Staphylococcus aureus* from honey bee digestive tract. **Iranian J. Vet. Res.**, University of Shiraz, v.6, n.2, 2005.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chem.**, Amsterdam, v.85, p. 305-313, 2004.

FARIA, J.A.F. Shelf life testing of honey. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.13, n.1, p.58-66, 1993.

FINOLA, M.S.; LASAGNO, M.C.; MARIOLI, J.M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chem.**, Amsterdam, v.100, p. 1649-1653, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2. ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1996.

GRAAF, D.C.; VANDEKERCHOVE, D.; DOBBELAERE, W.; PEETERS, J.E.; JACOBS, F. J. Influence of the Proximity of American Foulbrood Cases and Agricultural Management on the Prevalence of *Paenibacillus larvae* Spores in Belgian honey. **Apidologie**, Les Ulis, v. 32, p. 587-599, 2001.

HAUSCHILD, A.H.W.; HILSHEIMER, R.; WEISS, K.F.; BURKE, R.B. Clostridium botulinum in Honey, Syrups and Dry Infant Cereals. **J. Food Prot.**, v.51, n.11, p. 892-894, 1988.

HILLEGAS, S.L.; DEMIRCI, A. Inactivation of *Clostridium sporogenes* in clover honey by pulsed uv-light treatment. **Agric. Eng. Int.**, v. 5, p. 1-7, 2003.

HUHTANEN, C.N. Gamma Radiation Resistance of Clostridium botulinum 62A and Bacillus Subtilis Spores in Honey. **J. Food Prot.**, v.54, n.11, p. 894-896, 1991.

ICMSF. Microorganisms in food 1. **Their Significance and Methods of Enumeration**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Economia. Agropecuária. Pecuária Municipal – **APM**. Publicação Completa. Produção da pecuária municipal 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.com.br>>. Acesso em 25 jan. 2010.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA. Mel: Exportações Fazem Produção Aumentar de Norte a Sul. **IEA**. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=2078>> Acesso em: 21/07/2005

IEMMA, J.; ALCARDE, A.R.; DOMARCO, R.E.; SPOTO, M.H.F.; BLUMER, L.; MATRAIA, C. Radiação Gama na Conservação do Suco Natural de Laranja. **Sci. Agric.**, Piracicaba, v. 56 n. 4, p. 1.193-1.198, 1999.

INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION. **Training manual on operation of food irradiation facilities**. Vienna: ICGFI, 1992. 216p.

IENGARD, H.D.; PRÄGER, H. Water determination in products with high sugar content by infrared drying. **Food Chem.**, Amsterdam, v.82, n.1, p.161-167, 2003.

IENGARD, H.D.; SCHULTEIB, D.; RADOVIC, B.; ANKLAM, E. Alternatives to official analytical methods used for the water determination in honey. **Food Control**, Amsterdam, v.12, p.459-466, 2001.

IENGARD, H.D.; SCHULTEIB, D. Water determination in honey – Karl Fischer titration, an alternative to refractive index measurements. **Food Chem.**, Amsterdam, v.82, n.1, p.151-154, 2003.

JANZOWSKI, C.; GLAAB, V.; SAMIMI, E.; SCHLATTER, J.; EISENBRAND, G. 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potencial and reactivity towards cellular glutathione. *Food and chemical toxicology*, v.38, n.9, p.801-809, 2000

KASKONIENE, V.; VENSKUTONIS, P.R.; CEKSTERYTE, V. Carboydrate composition and electrical condutivity of different origin honeys from Lithuania. **Food Sci. Techn.**, v.43, p.801-807, 2010.

KELLY, J.F.D.; PETISCO, C.; DOWNEY, G. Application of Fourier transform Mid-infrared spectroscopy to the discrimination between Irish artisanal honey and sush honey adulterated with various sugars syrups. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, n.17, p.6166-6171, 2006.

KERR, W. E. Kerr e as abelhas um caso antigo. **Ciênc. Hoje**. 01/2002 Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/materia/view/803>>, Acesso em 09/02/2009

KOCHANSKI, J.; KNOX, D.A.; FEUDLAUFER, M.; PETTIS, J.S. Screaning alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and –resistant *Paenibacillus larvae*. **Apidologie**, v.32, p.215-222, 2001.

KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A. C .C., Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera L.*, 1758 (Himenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e proteína. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas,v.22, n.2, p. 143-146, 2002.

KRELL, R. **Value-added products from beekeeping**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 1996. 409p.

KÜPLÜLÜ, Ö.; GÖNCÜOĞLÜ, M.; ÖZDEMİR, H.; KOLUMAN, A. Incidence of *Clostridium botulinum* spores in honey in Turkey. **Food Control**, Amsterdam, v.17, p. 222-224, 2006.

LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOSATA, J.; TITERA, D.; KULT, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chem.**, Amsterdam, v.101, p. 973-979, (2007).

LEITE, J.M.C.; TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; MARIA, C.A.B. Determination of oligosaccharides in Brazilian honey of different botanical origin. **Food Chem.**, Amsterdam, v.70, p.93-98, 2000.

LICHTENBERG-KRAAG, B.; HEDTKE, C.; BIENEFELD, K. Infrared spectroscopy in routine quality analysis of honey. **Apidologie**, Les Ulis, v33, p. 327-337, 2002.

LINDSTRÖM, A.; KORPELA, S.; FRIES, I. The distribution of *Paenibacillus larvae* spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood disease brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. **J. Invert. Path.** v.99, p.82-86, 2008

MARCHINI, L.C. Apicultura: um padrão nacional para o mel. Pesquisa FAPESP n.59, 2000. Disponível em:
<<http://revistapesquisa.fapesp.br:2222/?lang=pt&issue=20001159>>. Acesso em: 12/04/2003.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. M. A. *Bacillaceae*, fungos e aflatoxina em mel. **Rev. Port. Cien. Vet.** Portugal, v.98, n.546, p. 85-88, 2003.

MATEO, R.; BOSH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. **J. Agric. Food Chem.** Columbus, v.46, n.1, p. 393-400, 1998.

MATO, I.; HUIDOBRO, J. F.; CENDON, V.; MUNIATEGUI, S.; FERNANDEZ-MUINO, M.A.; SANCHO, M.T. Enzymatic determination of citric acid in honey by using polyvinylpolypyrrolidone clarification. **J. Agric. Food Chem.** Columbus, v.46, n.1, p.141-144, 1998.

MATSUDA, A.H. **Aplicação da técnica de irradiação gama para a preservação de própolis.** São Paulo, 2002. 99p. Dissertação de mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo.

MENDES, E.; PROENÇA, E. B.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. Quality evaluation of portuguese honey. **Carbohyd. Polym.**, v. 37, p. 219-223, 1998.

MERCOSUL. Grupo do Mercado em Comum (GMC). **Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Mel.** Resolução Nº 15/94 de 1º de janeiro de 1995. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC_RES_1994-015.pdf>. On line. Acesso em 25/02/2010.

MIGDAL, W.; OWCZARCZYK, H.B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA- KEDZIA, E.; MADAJCZYK, D. Microbiological Decontamination of Natural Honey by Irradiation. **Rad. Phys. Chem.**, v. 57, p.285-288, 2000.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Growth inhibition of foodboorne patogens and food spoilage organisms by select raw honey. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, p.1-8, 2004.

NEUENDORF, S.; HEDTKE, K.; TANGEN, G.; GENERSCH, E. Biochemical characterization of different genotypes of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, a honey bee bacterial patogen. **Microbiol.**, Great Britain v. 150, p.2381-2390, 2004.

NOVASSINA. Thermoconstanter Humidat – TH2/TH1: Operation Manual. Zurich, [s.d.] 39p

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; DIEGO, J.C.; GÓMEZ, L.A.; RUIZ, J.M.; HIGES, M. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. **J. Chromatogr. A.**, Amsterdam, v.881, n.1/2, p.629-638, 2000.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; PORIBIO, L.; JIMÉNEZ, J.J.; MARTIN, M.T. High-performance liquid chromatographic determination of methyl anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. **J. Chromatogr., A**, Amsterdam, v.917, p.95-103, 2001.

OLEMPСКА-BEER, Z. Asperginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. (CTA), p.1-7, 2008.

OZCAN, M.; ARSLAN, D; CEYLAN, D. A.; Effect of inverted saccharose on some properties of honey. **Food Chem.**, Amsterdam, v.99, p.24-29, 2006.

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

PODADERA, P. **Estudo das propriedades do açúcar líquido invertido processado com radiação gama e feixes de elétrons.** São Paulo, 2007. 99p. Tese de Doutorado – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo.

RAGAZINI, A.V.F.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; DELFINO, T.P.C.; POIATTI, M.L.; BERCHIELLI, S.P. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros estados brasileiros. **Ciên. Rur.**, Santa Maria, v.38, n.2, p.396-399, 2008.

RALL, V. L. M.; BOMBO, A. J.; LOPES, T. F., CARVALHO, L. R.; SILVA, M.G. Honey consultation in the state of São Paulo: a risk to human health? **Int. J. Food Microbiol.**, Oxford, v.9, n.6 , p. 299-303, 2003.

REID, L.; DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Sci. Techn.**, v.17, p.344–353, 2006.

REYNES, F.G.R. Controlando a contaminação de alimentos ou resíduos de medicamentos veterinários. **J. UNICAMP**, Campinas, 5 a 18 de outubro de 2009, Nº 444. Disponível: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/outubro2009/ju444_pag09.php>. Online: Acesso em 25/02/2010.

RODAS, M.A.B.; TAVARES, M.; MARSIGLIA, D.A.P. Avaliação das características sensoriais de alimentos sob o ângulo de legislação brasileira. **BIAL: Bol. Ins. Adolfo Lutz**. v.14, n.1/2, p.5-7, 2004.

ROSSI, N.F.; MARTINELLI, L.A.; LACERDA, T.H.M.; CAMARGO, P.B.; VICTÓRIA, R.L. Análise da adulteração de méis por açúcares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono¹. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.19, n.2, p.1-16, 1999.

RUOFF, K.; IGLESIAS, M.T.R.; LUGINBÜHL, W. BOSSET, J.O.; BOGDANOV, S. AMADO, R. Quantitative analysis of physical and chemical measurands in honey by mid-infrared spectrometry. **Eur. Food Res. Techn**, v.223, n.1, p.22-29, 2006.

RUOFF, K.; LUGINBÜHL, W.; BOGDANOV, S; BOSSET, J.O.; ESTERMANN, B.; ZIOLCO, T.; KHERADMANDAN, S. AMADO, R. Quantitative determination of physical and chemical meansurands in honey by near-infrared spectrometry. **Eur. Food Res. Techn.**, v.225, n.3/4, p.415-423, 2007.

SAKUMA, A.M.; KIRA, C.S.; CANO, C.B.; MARSIGLIA, D.A.P.; CARVALHO, M.F.H; MELLO, M.R.P.A.; GARBELOTTI, M.L.; CARUSO, M.S.F.; PASCUET, N.S.; ZENEBON, O.; RODRIGUES, R.S.M.; PIMENTEL, S.A.; (colab.). Procedimentos e determinações gerais. In: INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: ANVISA, 2005. Cap.4, p. 83-158.

SANCHO, M.T.; MUNIATEGUI, S.; HUIDOBRO, J.F.; LOZANO, J.S. Aging of honey. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.40, p.134-138, 1992.

SCHUCH, D.M.T.; MADDEN, R.H.; SATTLER, A. An improved method for the detection and presumptive identification of *Paenibacillus larvae* subsp. *Larvae* spores in honey. **J. Apicult. Res.**, v40, n.2, p. 59-64,2001.

SERRA, J.; VENTURA, F.; Characterization of citrus honey (*Citrus* spp.) produced in Spain. **J. Agric. Food Chem.**, v.43, p.2053-2057. 1995.

SERRANO, R.B. La miel: edulcorante natural por excelencia. **Alimentaria**, Madrid, n.29, p.29-35, 1994.

SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 31, n.1-3, p. 1-26, 1996.

SHUSTER, E.; DUMM-COLEMAN, N.; FRISVARD, J.C.; VAN DIJCK, P.W.M. On the safety of *Aspergillus niger* a review. **Appl. Microbiol. Biotecnol.** v. 59, p. 426-435, 2002.

SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C; OTSUK, I.P; CARVALHO, C.A.L. Caracterização físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) do Estado do Ceará. **Cienc. Rur.**, v.37, n.04, p.1139-1144, 2007.

SOUSA, D. C. **Apicultura**: Manual do agente de desenvolvimento rural. Ed. 2, Brasília: Sebrae, 2007, 186p.

SPÜRGIN, A. **A Apicultura**. Lisboa: Presença, 1997. 112p.

STRONG, F.C.; DUARTE, A.M.A. Análise de méis comerciais brasileiros para detectar adulteração com xarope de milho. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.5, n.2, p.116-122, 1985.

SWALLOW, K.W.; LOW, N.H. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v.38, n.9, p.1828-1832, 1990.

TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RÉ, E.; LUCERO, H. Honey thermal treatment effects on hidroxymethylfurfural content. **Food Chem.**, Amsterdam, v.77, p.71-74, 2002.

TOZETTO, A.; DEMIATE, I. M; NAGATA, N. Análise exploratória de adoçantes de mesa via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e análise por componentes principais (ACP). **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v.27, n.4, p.723-728, 2007

USPC, **Microbiological examination of nonsterile products**: Micobial enumeration tests. n.61, p.1-12, 2009. Disponível em:
<http://127.0.0.1:32270/uspnf/pub/data/v32270/usp32nf27s0_c61h.xml>. Acesso em: 15/12/2009

VILCKAS, M.; GRAMACHO, K.P.; GONÇALVES, L.S.; MARTINELLI, D.P. Perfil do consumidor de mel e o mercado de mel. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 64, p.1-17, 2003. Disponível em:
<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/64/artigo_.htm>. Acesso em: 06/02/2004

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; CÓRDOBA, M.H. Simultaneous liquid chromatographic analysis of 5-(hidroxymethyl)-2-furfuraldehyde and methyl anthranilate in honey. **Food Chem.**, Amsterdam, v.44, p.67-72, 1992.

WIESE, H. **Apicultura: Novos tempos**. Guaíba, Livraria e Editora Agropecuária, 2000. 423p.

WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near infrared technology in the agriculture and food industries**. 2. ed. St. Paul: American Assiciation of Cereal Chemists, p.165

WHITE, J.W. Composition of honey. In CRANE, E. **Honey**: a comprehensive survey. London: Heinemann, 1975. p.207-239.

WHITE, J.W. Hydroxymethylfurfural content of honey as an indicator of its adulteration with invert sugars. **Bee World**, Gerrard Cross, v.61, n.1, p.29-37, 1980.

WUNDERLIN, D.A.; PESCE, S.F.; AMÉ, M.V.; FAYE, P.F. Decomposition of hidroximetilfurfural in solution and protective effect of fructose. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.1855-1863,1998.

ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J.; ROLDÁN, D. On the nature of the relationship between water activity and % moisture in honey. **Food Control**, Amsterdam, n.17, p.642-647, 2006.