

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**ESCOLA DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE**  
**PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA**  
**E SENSORIAL DE MÉIS FLORAIS IRRADIADOS.**

**FÁBIO CERDEIRA LIRIO**

**RIO DE JANEIRO**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**  
**ESCOLA DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE**  
**PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA**  
**E SENSORIAL DE MÉIS FLORAIS IRRADIADOS.**

**FÁBIO CERDEIRA LIRIO**

**SOB A ORIENTAÇÃO DOS PROFESSORES:**  
**ANA LÚCIA DO AMARAL VENDRAMINI.**  
**MAURO CARLOS LOPES SOUZA.**

**DISSERTAÇÃO APROVADA COMO**  
**REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE**  
**EM CIÊNCIAS NO PROGRAMA DE TECNOLOGIA**  
**DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS.**

**RIO DE JANEIRO, RJ**  
**MAIO DE 2010.**

L768c Lirio, Fábio Cerdeira.

Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de méis florais irradiados/ Fábio Cerdeira Lirio – 2010.

xx, 154 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadores: Ana Lúcia do Amaral Vendramini e Mauro Carlos Lopes Souza.

1. Méis florais. 2. Irradiação. 3. Físico-química. 4. Microbiologia. 5. Análise sensorial. – Teses. I. Vendramini, Ana Lúcia do Amaral (Orient.). II. Souza, Mauro Carlos Lopes (Orient.). III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química. IV. Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de méis florais irradiados.

CDD: 664.028 8

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E  
SENSORIAL DE MÉIS FLORAIS IRRADIADOS.**

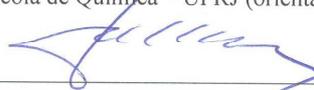
**FÁBIO CERDEIRA LIRIO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

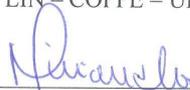
Aprovada por:



Ana Lúcia do Amaral Vendramini, D.Sc.  
Escola de Química – UFRJ (orientadora)



Mauro Carlos Lopes Souza, D.Sc.  
LIN – COPPE – UFRJ (orientador)



Mirian Ribeiro Leite Moura, D.Sc.  
Faculdade de Farmácia- UFRJ



Ricardo Felipe Alves Moreira, D.Sc.  
Instituto Biomédico - UNIRIO



Karen Signori Pereira, D.Sc.  
Escola de Química - UFRJ

## **AGRADECIMENTOS:**

A Deus, por ter me dado saúde, paciência, lucidez e forças durante esta árdua batalha, me conduzindo sempre pelo melhor caminho;

Aos meus pais Maria e Roberto, meus avós Maria e Ricardo, a minha irmã Roberta e aos meus tios José e Márcia e primos Eduardo, Felipe e Rodrigo e a amiga Flávia, exemplos de honradez e dedicação, sempre presentes e me dando a força necessária para continuar, me apoiando incondicionalmente nos momentos mais adversos;

Aos Professores Dr. Márcio José Estillac de Mello e Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura, pela orientação acadêmica durante a graduação, amizade, dedicação e incentivo;

À Professora Dra. Ana Lúcia do Amaral Vendramini e ao Professor Dr. Mauro Carlos Lopes Souza, pela orientação, dedicação, amizade, incentivo e, principalmente, pela confiança no meu trabalho;

Ao Dr. Décio Menezes por ter fornecido as amostras de méis para que este projeto se iniciasse;

Ao Professor Ricardo Tadeu Lopes por ter cedido às instalações do LIN para que o projeto fosse desenvolvido e todos os funcionários do LIN;

Aos amigos do LABCBROM Ana, Ana Carolina, Ângelo, Camila, Carolina, Cláudia, Daniela, Ediane, Eduardo, Izaías, Jacqueline, Lara e Larissa, pela atenção, paciência e colaboração, sobretudo nos momentos mais difíceis;

A todos os amigos que contribuíram para que este projeto fosse realizado.

## RESUMO:

LIRIO, Fábio Cerdeira. **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E SENSORIAL DE MÉIS FLORAIS IRRADIADOS**. 2010. 154p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, RJ, 2010.

Os méis florais são alimentos de sabor doce e aroma agradável elaborados pelas abelhas melíferas a partir do néctar. Este alimento contém diversas moléculas de interesse como flavonóides, ácidos fenólicos, vitaminas e glicídios com potencial prebiótico, sendo apreciados por suas propriedades sensoriais e consumidos na forma pura ou como ingrediente na indústria alimentícia. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de méis, entretanto a apicultura brasileira é considerada rudimentar, e a qualidade microbiológica é mínima, sendo freqüente a contaminação de méis por microrganismos patogênicos como bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* e fungos produtores de micotoxinas. Em consonância com a tendência de busca pelo consumidor de alimentos com alta qualidade nutricional, inocuidade e aspectos sensoriais próximos ao alimento original, novas tecnologias têm sido utilizadas alternativamente aos processamentos térmicos de conservação, sendo a irradiação bastante promissora. A radiação gama possibilita o prolongamento do tempo de prateleira, redução de microrganismos patogênicos, desinfestação e esterilização, possuindo aplicação em vários alimentos. O trabalho teve como objetivo a caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de méis monoflorais de eucalipto e de laranjeira e polifloral silvestre irradiados a 5, 10, 15 e 25 kGy. Foi feita a avaliação dos parâmetros físico-químicos através do teste de Tuckey a 5% de significância para umidade, sólidos solúveis totais, pH, acidez livre, açúcares redutores livres e totais, sacarose aparente, conteúdo de 5-HMF e atividade diastásica constatando que quando se irradia os méis com 5 e 10 kGy há um rearranjo complexo de glicídios, pequeno aumento significativo do conteúdo de 5-HMF e ligeira redução da acidez livre. Os resultados mostram que o aumento da dose irradiante eleva o número de alterações significativas dos parâmetros físico-químicos das amostras irradiadas quando comparadas a condição controle. A caracterização microbiológica foi feita através de investigações usando meios seletivos para *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e meios convencionais para bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras. Os resultados indicaram ausência de contaminações especificamente investigadas e baixas contagens de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras nas amostras controle. A irradiação nas doses de 5 e 10 kGy ocasionaram uma redução significativa das contagens de bactérias mesófilas aeróbias, fungos filamentosos e leveduras. Executou-se o teste de diferença em relação ao controle constatando-se que as amostras de todas as floradas quando irradiadas a 5 kGy não diferiram significativamente a nível de 5% das respectivas amostras controle, e as amostras irradiadas a 10 kGy dos méis monofloral de eucalipto e polifloral silvestre diferiram significativamente das amostras controle. O teste de preferência verificou que há predileção para as amostras na sua condição original, portanto a irradiação de méis a 5 kGy não gera diferença significativa nos atributos sensoriais, sendo esta recomendada pela manutenção da originalidade do produto, reduzido número de alterações físico-químicas observadas e alta capacidade de eliminar microrganismos.

**Palavras-chave:** méis florais, irradiação, parâmetros físico-químicos, microbiologia e análise sensorial.

## ABSTRACT:

LIRIO, Fábio Cerdeira. **PHYSICOCHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND SENSORY CHARACTERIZATION OF IRRADIATED FLORAL HONEYS.** 2010. 154p. Dissertation (Masters in Chemical and Biochemical Process Technology). School of Chemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, RJ, 2010.

Honey is a food with sweet taste and pleasant aroma produced by bees from nectar. It contains several molecules of interest such as flavonoids, phenolic acids, vitamins and carbohydrates with prebiotic potential, valued for its sensory properties and consumed either pure or as ingredient in food industry. Brazil is one of the world's largest producers of honey, however the Brazilian beekeeping is rudimentary and microbiological quality is minimal, and honeys are usually contaminated by pathogenic microorganisms such as spore-forming bacteria *Bacillus* and *Clostridium* and mycotoxin-producing fungi. With the trend of consumers search for foods with high nutritional quality, safety and sensory aspects close to the original product, new technologies have been used alternatively to the thermal processes of conservation, and irradiation is a promising technology. The gamma radiation allows the extension of shelf life, pathogens microorganisms' reduction, desinfestation and sterilization, and has applications in various foods. The aim of this work was physico-chemical, microbiological and sensory characterization of eucalyptus and citrus monofloral and polyfloral honeys irradiated at 5, 10, 15 e 25 kGy. The evaluation of physicochemical parameters was made by Tukey test at 5 % significance for moisture, total soluble solids, pH, free acidity, free and total reducing sugars, sucrose, 5-HMF content and diastase activity observed that honeys irradiated at 5 and 10 kGy demonstrated a complex glycidic rearrange, small increased in 5-HMF content and slight reduction of free acidity. The results indicated that increased of the radiant dose raised the number of significant changes in physicochemical parameters of irradiated honeys when compared to control. The microbiological characterization was made through investigations using selective culture media for *Bacillus cereus*, *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and conventional media for mesophilic aerobic bacteria, fungi and yeasts. The results indicated no specifically investigated contamination and low counts of mesophilic aerobic bacteria, fungi and yeasts in control samples. Irradiation at 5 and 10 kGy caused a significant reduction in counts of aerobic mesophilic bacteria, fungi and yeasts. The test of difference from control demonstrated that samples of all blossoms irradiated at 5 kGy did not present significant difference at 5 % of control samples and samples irradiated at 10 kGy of eucalyptus monofloral and polyfloral honeys differed significantly at 5 % of control samples. The preference test showed a predilection for samples in original condition, so honeys' irradiation at 5 kGy did not generate significant differences in sensory attributes, recommended for maintain the originality of the product, reduced number of physicochemical alterations and high ability to eliminated microorganisms.

**Keywords:** Floral honeys, irradiation, physicochemical parameters, microbiology and sensory.

## SUMÁRIO DE ABREVIATURAS:

Aa – Atividade aquosa.  
ANOVA – Análise de Variância.  
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.  
AOAC – Association of Official Analytical Chemists.  
PDA – Batata Dextrose Ágar.  
BP – Ágar Baird-Parker.  
CAC – Codex Alimentarius Commission.  
CDC – Center of Disease Control.  
CENA – Centro de Energia Nuclear na Agricultura.  
CMF – 5-Clorometilfurfural.  
CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear.  
CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos.  
CV% - Coeficiente de variação expresso em percentual.  
DNA – Ácido Desoxiribonucléico.  
FAO – Food and Agriculture Organization.  
FDA – Food and Drug Administration.  
GMC – Grupo Mercado Comum.  
Gy – Grays.  
Gy/min – Grays por minuto.  
HE – Ágar Entérico de Hektoen.  
HMF – 5-Hidroximetilfurfural.  
IAEA - International Atomic Energy Agency.  
ICGFI - Grupo Consultor Internacional para Irradiação de Alimentos.  
IHC – International Honey Commission.  
kGy – Quilograys.  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.  
MERCOSUL – Mercado Comum do Sul.  
MeV – 10<sup>6</sup> elétron-volts.  
Mex/MS/Ma – Grupo Interministerial de Trabalho.  
mg/Kg – Miligrama por quilogramas.  
MIT – Massachusetts Institute of Technology.  
MPY – Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina.  
PCA - Ágar Padrão para Contagem em Placa.  
RNA – Ácido ribonucléico.  
SC – Caldo Selenito Cistina.  
SD – Desvio Padrão.  
SEBRAE – Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas.  
SMF – 5-Sulfoximetilfurfural.  
SNC – Sistema Nervoso Central.  
SS – Ágar Salmonella-Shigella.  
TT – Caldo Tetrionato.  
UFC/g – Unidades formadoras de colônia por grama.  
XLD – Ágar Xilose Lisina Desoxicolato.  
XLT4 – Ágar Xilose Lisina Tergitol 4.  
WHO – World Health Organization.

## SUMÁRIO DE TABELAS:

Tabela 1: Gêneros de microrganismos relatados em méis.	024
Tabela 2: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis poliflorais silvestres em função das doses irradiantes aplicadas.	077
Tabela 3: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis monoflorais de eucalipto em função das doses irradiantes aplicadas.	077
Tabela 4: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis monoflorais de laranja em função das doses irradiantes aplicadas.	078
Tabela 5: Contagem em UFC/g dos respectivos microrganismos específicos pesquisados para as amostras na condição controle.	087
Tabela 6: Contagem em UFC/g em meios de cultura PCA para bactérias mesófilas aeróbias de méis na condição controle e irradiadas a 5 e 10 kGy.	090
Tabela 7: Contagem média em UFC/g de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura BDA de amostras de méis na condição controle e a 5 e 10 KGy.	092
Tabela 8: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis monoflorais de eucalipto durante o teste de diferença em relação ao controle.	093
Tabela 9: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis monoflorais de laranja durante o teste de diferença em relação ao controle.	095
Tabela 10: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis poliflorais silvestres durante o teste de diferença em relação ao controle.	096

## SUMÁRIO DE EQUAÇÕES:

Equação 1: Fórmula para o cálculo da taxa de dose	066
Equação 2: Fórmula para o cálculo da constante de decaimento	066
Equação 3: Fórmula para o cálculo da taxa de dose atual da fonte de Cobalto-60	067
Equação 4: Fórmula para o cálculo da acidez livre	068
Equação 5: Fórmula para determinação da porcentagem de resíduo mineral fixo (cinzas)	069
Equação 6: Fórmula para o cálculo de açúcares redutores livres	070
Equação 7: Fórmula para o cálculo de açúcares redutores totais	071
Equação 8: Fórmula para o cálculo da sacarose aparente	071
Equação 9: Fórmula para o cálculo da atividade diastásica	072
Equação 10: Fórmula para o cálculo do conteúdo de hidroximetilfurfural.	072

## SUMÁRIO DE FIGURAS:

Figura 1: Etapas do processamento de méis.	014
Figura 2: Equipamentos de proteção individual e máquinas envolvidas no processamento de méis.	015
Figura 3: Formação do ácido glicônico pela ação da enzima glicose oxidase.	020
Figura 4: Radura, símbolo universal de alimentos irradiados.	040
Figura 5: Utilização da irradiação de alimentos no mundo.	041
Figura 6: Gêneros alimentícios irradiados no mundo em 2005.	041
Figura 7: Espectro eletromagnético.	042
Figura 8: Características das fontes de radiação.	043
Figura 9: Conseqüências da irradiação na molécula de DNA.	046
Figura 10: Possíveis reações radicalares envolvendo carboidratos.	049
Figura 11: Reações radicalares oriundas da irradiação envolvendo aminoácidos.	050
Figura 12: Reações radicalares em compostos aminados promovidas pela irradiação.	051
Figura 13: Estabilidade das vitaminas frente à irradiação	054
Figura 14: Efeitos da irradiação no amadurecimento de bananas	058
Figura 15: Efeitos da radiação ionizante no brotamento de batatas	059
Figura 16: I - Amostras em potes de 1Kg e 2Kg ; II – Acondicionamento das amostras no interior do tubo de PVC e preenchimento com discos de acrílico ; III – Amostras armazenadas em frascos de 250g ; IV – Irradiador do Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN)	067
Figura 17: Progressão da reação de carbonização executada em fonte convencional de aquecimento	069
Figura 18: Reação base de redução do cobre pelo método Lane-Eynon	070
Figura 19: Progressão da reação para determinação de açúcares redutores livres (método de Lane & Eynon)	070
Figura 20: Comparação entre condição controle e amostra irradiada com 15K Gy em termos de formação de espuma	076
Figura 21: Flutuações observadas para o parâmetro umidade das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	080
Figura 22: Flutuações observadas para o parâmetro acidez livre das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	081
Figura 23: Flutuações observadas para o parâmetro pH das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	082
Figura 24: Flutuações observadas para o parâmetro HMF das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	083
Figura 25: Flutuações observadas para o parâmetro atividade diastásica das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	084
Figura 26: Flutuações observadas para o parâmetro açúcares redutores livres das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	086
Figura 27: Flutuações observadas para o parâmetro açúcares redutores totais das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	086
Figura 28: Flutuações observadas para o parâmetro sacarose aparente das distintas floradas em diferentes doses irradiantes	086
Figura 29: Colônias não características acinzentadas no Ágar Baird-Parker	088
Figura 30: Placas de Petri contendo meio MPY. I: Crescimento não característico de colônias amareladas observados em duas amostras. II: Em a se observa resultado negativo para uma das amostras, e em b visualizamos o controle positivo	089
Figura 31: Colônias visualizadas nas placas em meio PCA	090
Figura 32: Histograma referente às respostas obtidas para freqüência de consumo de méis	098

Figura 33: Gráfico referente às respostas obtidas para local de consumo de méis	098
Figura 34: Gráfico referente às respostas obtidas para horário de consumo de méis	099
Figura 35: Histograma referente às respostas obtidas para condição de consumo de méis	100
Figura 36: Gráfico referente às respostas obtidas para motivação de consumo de méis	100
Figura 37: Gráfico referente ao resultado do teste de preferência para os méis monoflorais de eucalipto	101
Figura 38: Histograma referente aos critérios de preferência obtidos para méis monoflorais de eucalipto	102
Figura 39: Gráfico referente ao resultado do teste de preferência para os méis silvestres	103
Figura 40: Histograma referente aos critérios de preferência para méis silvestres	104

## SUMÁRIO:

	<b>PÁG</b>
1. INTRODUÇÃO	001
2. OBJETIVOS	004
2.1. Objetivos gerais	004
2.2. Objetivos específicos	004
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	005
3.1. O mel e seu histórico	005
3.2. Definição, características e classificação	007
3.3. O mel como alimento e medicamento	009
3.4. Composição nutricional e funcionalidade	010
3.5. Legislação, importância econômica e adulterações	012
3.6. Produção e processamento	014
3.7. Parâmetros físico-químicos	016
3.8. Microbiologia dos méis	023
3.8.1. Microrganismos específicos	028
3.8.1.1. <i>Bacillus cereus</i>	028
3.8.1.1. <i>Clostridium botulinum</i>	030
3.8.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	032
3.8.1.3. <i>Salmonelas</i>	034
3.8.1.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	036
3.9. Irradiação	037
3.9.1. Introdução e histórico	037
3.9.2. Irradiação de alimentos no Brasil	038
3.9.3. Tendências e mercado	040
3.9.4. Princípios da irradiação	042
3.9.5. Equipamentos utilizados	042
3.9.6. Vantagens e limitações	044
3.9.7. A inativação de microrganismos pelo uso da radiação	044
3.9.8. Efeitos básicos da radiação ionizante	047
3.9.8.1. Radiólise da água	048
3.9.8.2. Efeito da irradiação nos carboidratos	049
3.9.8.3. Efeito da irradiação sobre as proteínas	050
3.9.8.4. Efeito da irradiação sobre as vitaminas	052
3.10. Benefícios dos alimentos irradiados	054
3.10.1. Redução dos microrganismos patogênicos	055
3.10.2. Descontaminação e esterilização	055
3.10.3. Radurização	057
3.11. Irradiação de méis	059
3.12. Análise sensorial	061
3.12.1. Aspectos gerais	061
3.12.2. O uso da análise sensorial em méis	062
3.12.3. Alterações sensoriais promovidas pela irradiação	065
4. MATERIAIS E MÉTODOS	066
4.1. Aquisição e irradiação das amostras	066
4.2. Avaliação dos parâmetros físico-químicos	068
4.2.1. Umidade e sólidos solúveis totais	068
4.2.2. pH e acidez livre	068
4.2.3. Resíduo mineral fixo (cinzas)	069
4.2.4. Açúcares redutores livres	069

4.2.5.	Açúcares redutores totais	071
4.2.6.	Sacarose aparente	071
4.2.7.	Atividade diastásica	071
4.2.8.	Conteúdo de 5-hidroximetilfurfural	072
4.3.	Análises microbiológicas	072
4.3.1.	Contagem de bactérias aeróbias mesófilas	072
4.3.2.	Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	073
4.3.3.	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	073
4.3.4.	Contagem de <i>Salmonella sp.</i>	073
4.3.5.	Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	073
4.3.6.	Contagem de fungos filamentosos e leveduras	073
4.4.	Análise sensorial	073
4.4.1.	Teste de diferença em relação ao controle (teste triangular)	073
4.4.2.	Teste de preferência	074
4.4.3.	Perfil do consumidor	075
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	076
5.1.	Constatações gerais das análises físico-químicas	076
5.2.	Resultados das análises físico-químicas	077
5.2.1.	Comparação com a legislação e análise estatística	078
5.2.1.1.	Umidade	079
5.2.1.2.	Acidez livre	080
5.2.1.3.	pH	081
5.2.1.4.	HMF	082
5.2.1.5.	Atividade diastásica	083
5.2.1.6.	Açúcares redutores livres, açúcares redutores totais e sacarose aparente	084
5.2.1.7.	Sólidos totais (°Brix)	087
5.2.1.8.	Resíduo mineral fixo (cinzas)	087
5.3.	Análises microbiológicas	087
5.3.1.	Microbiologia das amostras controle	087
5.3.2.	Contagem total de bactérias mesófilas	090
5.3.3.	Contagem total de fungos filamentosos e leveduras	092
5.4.	Análise sensorial	093
5.4.1.	Teste de diferença em relação ao controle (teste triangular)	093
5.4.1.1.	Mel monofloral de eucalipto	093
5.4.1.2.	Mel monofloral de laranjeira	095
5.4.1.3.	Mel polifloral silvestre	096
5.4.3.	Teste de preferência	097
5.4.3.1.	Perfil do consumidor	097
5.4.3.1.1.	Frequência de consumo	098
5.4.3.1.2.	Localidade de consumo	098
5.4.3.1.3.	Horário de consumo	099
5.4.3.1.4.	Condição de consumo	100
5.4.3.1.5.	Motivações atribuídas ao consumo	100
5.4.3.2.	Mel monofloral de eucalipto	101
5.4.3.3.	Mel polifloral silvestre	103
6.	CONCLUSÕES	105
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS	106
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
9.	APÊNDICES	135
10.	ANEXOS	139

## **1- INTRODUÇÃO:**

A apicultura é uma das atividades mais antigas e importantes do mundo, pois apresenta uma alternativa de ocupação e de renda econômica para o homem, que tem como principal meio de subsistência o agronegócio. Assim, através da produção do mel e de produtos oriundos da apicultura (geléia real, pólen, própolis, cera e apitoxina) tal atividade mostra sua robustez. A apicultura é designada como agradável, de fácil manutenção e de baixo custo em relação às outras atividades agropecuárias, ou seja, constitui-se uma notável fonte de renda para a população campesina, uma vez que tais produtos gerados possuem um alto valor agregado.

O mel, em conjunto com o pão e o vinho, certamente é um dos alimentos mais antigos da história humana, e a sua importância não se restringe somente às civilizações antigas, tendo uma inegável relevância nos dias atuais como um produto natural, de grande apelo e com diversas aplicações funcionais. Portanto, este alimento, seu processamento e consumo se mesclam com a evolução humana, de modo que ele já era reconhecido por seus aspectos sensoriais peculiares e por sua disponibilidade vinculada à existência das abelhas melíferas. Entretanto, mesmo com esta observação, os primórdios da atividade apícola não se caracterizavam por um caráter preservacionista das abelhas.

Com o passar dos anos, aprendeu-se, empiricamente, que este possuía propriedades benéficas à saúde como a sua ação cicatrizante, o que difundiu o seu consumo e distintos usos. De fato, esta expansão se manifesta até os dias atuais, em que o alimento é utilizado em diversos produtos de origem natural, assim como, em produtos industrializados. O mel atingiu este patamar devido ao seu amplo mercado consumidor e pelos distintos tipos de méis florais existentes que conseguem englobar distintos mercados, por mais exigentes que estes sejam. A grande relevância atribuída ao mel, atualmente, é oriunda do aumento do interesse e de pesquisas dentro do campo de alimentos e suplementos de origem natural e consumo de alimentos minimamente processados, nos quais renasceu o interesse no uso terapêutico deste alimento. Certamente, ele não é designado simplesmente como um excelente adoçante, mas também é um alimento com propriedades nutricionais significativas, devido à presença de moléculas com potencial antioxidante, prebióticos e vitaminas.

Atualmente, dispõe-se de parâmetros que visam estabelecer a qualidade físico-química, microbiológica e sensorial dos méis, gerando um importante arcabouço de ações que visam o controle de qualidade.

Em contrapartida, apesar da evolução notável da produção e da qualidade, ainda existem desafios relacionados ao processamento, manejo e fontes de contaminação. O mel possui uma contaminação intrínseca relacionada a fontes primárias e secundárias. Então, pode veicular importantes microrganismos causadores de patologias humanas, sendo um exemplo nítido a bactéria *Clostridium botulinum*. Em alguns países, os relatos da presença dos esporos dela e de outros grupos de microrganismos são frequentes, o que evidencia a necessidade de medidas que impeçam que esta incidência represente um risco potencial à saúde humana. Outro desafio enfrentado pela apicultura se baseia na venda de méis em feiras e entrepostos de baixa confiabilidade, nos quais não se observam quaisquer tipos de fiscalização. Este é um aspecto extremamente preocupante, uma vez que não há avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, o que aumenta, consideravelmente, a chance de adulterações, que ocorrem especialmente quando há a baixa produção melífera. Assim, tais méis contêm notáveis diferenças, em termos de qualidade, quando comparados aos produtos originais.

Paralelamente, nas últimas décadas, também tem se observado uma elevação do número de doenças atribuídas a agentes biológicos como bactérias, fungos e helmintos presentes em alimentos. Estas doenças estão relacionadas a uma multiplicidade de fatores, como a expansão do comércio alimentar, aumento do consumo de alimentos industrializados e semi-prontos, modificações dos hábitos alimentares e refeições fora do domicílio.

Assim sendo, houve o incremento do interesse de uma parcela populacional em questões intimamente associadas à inocuidade alimentar, o que fomentou e estimulou a busca por novas alternativas de controle de contaminação proveniente de microrganismos, ou seja, novas tecnologias que pudessem resguardar a qualidade dos alimentos, minimizando perdas sensoriais. Neste contexto, existe uma gama de novas tecnologias direcionadas à eliminação de microrganismos. Dentre estas tecnologias, a irradiação de alimentos representa um recurso já ratificado e bem estabelecido para diversos alimentos, posto que sua história data de pelo menos 100 anos. A irradiação de alimentos é uma tecnologia de preservação classicamente consagrada pela sua alta capacidade de redução da carga microbiana e pelos seus amplos usos, como retardo do amadurecimento de frutos, bloqueio do brotamento de raízes e tubérculos, desinfestação de grãos e esterilização de condimentos; sendo uma tecnologia mais abrangente frente aos métodos de conservação e preservação de alimentos tradicionais. A aplicação da irradiação em méis constitui-se em um novo ramo em termos de pesquisa, fato este comprovado pelo reduzido número de publicações que tratam deste tópico.

A importância do estudo da irradiação em méis se fundamenta, simplesmente, pela apicultura em países como o Brasil ser majoritariamente rudimentar, sobretudo em áreas que

praticam a apicultura familiar, sem qualquer tipo de acompanhamento técnico e que objetiva fundamentalmente o reforço de renda, implicando em produtos que, inúmeras vezes, contêm uma carga contaminante alta, devido à ausência de boas práticas apícolas e boas práticas de manipulação.

Apesar dos benefícios da aplicação da irradiação, ela é vista como um dilema, especialmente para as populações que não possuem uma distinção precisa do seu significado e das suas conseqüências, gerando cautela em termos de aplicação massiva. Por este fato, a educação e a informação são peças cruciais para o entendimento e difusão da irradiação e devem ser fomentados por governos e universidades com programas, projetos, campanhas e estudos científicos. Mesmo com a presença de tais barreiras, a sua aplicação para o controle de microrganismos em méis constitui uma interessante opção que atualmente é pouco explorada.

Portanto, devido ao caráter prematuro deste tipo de estudo, não existem relatos sólidos na literatura científica acerca de alterações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais ocasionadas pelas variações de doses irradiantes aplicadas. Há um amplo campo de estudo a ser explorado, em vista da grande diversidade de floradas, de microrganismos contaminantes e a complexidade sensorial que o mel apresenta, além de uma grande quantidade de compostos que são responsáveis por seu perfil sensorial peculiar e único.

Baseado em tais observações, justifica-se um estudo amplo e complexo que avalie todos os parâmetros mencionados acima e fomente a produção científica, com intuito de impulsionar inovações na atividade apícola, principalmente em escala industrial.

## **2 - OBJETIVOS:**

### **2.1 – Objetivo geral:**

- Avaliar os parâmetros físico-químicos, o perfil microbiológico e o efeito da irradiação em amostras de três floradas de mel (laranjeira, eucalipto e silvestre) advindo de apiários de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, respectivamente.

### **2.2 - Objetivos específicos:**

- Irradiar com quatro doses irradiantes, amostras de três floradas de mel;
- Avaliar a diferença sensorial entre as amostras de méis irradiados ou não;
- Comparar o impacto das doses irradiantes nas amostras de mel sob os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais;
- Traçar o perfil de consumidor de mel.

### 3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

#### 3.1 - O mel e seu histórico:

Ao longo da evolução humana, sempre se considerou o mel um produto especial, empregado desde os tempos mais remotos. Evidências de seu uso aparecem desde a Pré-história, com inúmeras referências em pinturas rupestres, em manuscritos e pinturas do antigo Egito, Grécia e Roma (ARNAUD *et al.*, 2008).

Tal alimento sempre atraiu a atenção do homem, principalmente pelas características adoçantes, que levaram ao desenvolvimento de técnicas cada vez mais aprimoradas, com o intuito de induzir uma maior produtividade das abelhas (BERA e ALMEIDA-MURADIAN, 2007). O interesse humano pelos produtos apícolas vem do início das civilizações, fornecendo-lhe rica fonte de alimento (ARAUCO *et al.*, 2008b). Na história, ele foi uma das primeiras fontes de açúcar, e este fato é demonstrado pela sua utilização em conjunto com o pólen das abelhas nativas sem ferrão nos períodos pré-hispânicos e o papel que desempenharam na dieta das comunidades indígenas americanas (ALVES *et al.*, 2005). O testemunho mais antigo da apicultura é fornecido por pinturas rupestres datadas de mais de 7.000 anos a.C., encontradas em Valência, na Espanha (ARAUCO *et al.*, 2008b). De fato, isso é ratificado, por exemplo, pela observação dos materiais que os sumérios empregavam na sua escrita cuneiforme, sendo estas placas de cera onde imprimiram seus símbolos. Portanto, há fortes indícios de que este povo não só conhecia a cera, como sabia manuseá-la com perfeição. Relato semelhante se observa em relação aos egípcios, que no mesmo período, já conheciam a própolis que aplicavam não só medicinalmente para combater infecções, mas também, em embalsamamento (MASSON, 1994). Tais observações confirmam alguns outros relatos da literatura afirmando que há registros de que o mel tem sido empregado pelo homem, há mais de 6000 anos, seja como alimento ou como medicamento, devido às suas propriedades anti-sépticas, atividades antimicrobianas, regenerantes e cicatrizantes dos tecidos epiteliais e para conservação de frutas e grãos (CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1991; DELMAS, VIDON e SEBALD, 1994).

Na Grécia, justamente no ápice da civilização grega, a apicultura teve um grande desenvolvimento. A mitologia grega, aliás, é pródiga em histórias sobre o mel e as abelhas. Os gregos empregavam-no, principalmente, para alimentar suas crianças. Na Babilônia, existem evidências de seu uso medicinal há mais de 1300 anos a.C., e após a invasão deste território, editaram-se as primeiras leis sobre o mel (MASSON, 1994). Além disso, citações e referências frequentes ao mel são feitas na Bíblia Sagrada.

Apesar destes relatos antigos, a apicultura racional no Brasil começou a sua evolução em meados do século XX, onde o principal fator propulsor foi a inserção das abelhas africanas. Desde 1956, ano em que estas abelhas foram introduzidas no país, é significativo o avanço da apicultura. Isso se constata no ponto de vista do agronegócio, social e tecnológico. Nesse sentido, divide-se a história da apicultura brasileira em três etapas:

1. **Período de implantação** → Correspondeu ao início da exploração da apicultura pelos colonizadores europeus e foi alicerçado em tecnologias importadas da Europa, destacando-se sua influência principalmente na região Sul. A produção melífera, na ocasião (década de 50), ao redor de 5 mil toneladas/ano e era reduzida, se comparada a produção de países vizinhos, apesar do clima tropical e da flora disponível, propícia à apicultura. Tal fato chamou a atenção das autoridades, que convidaram o geneticista brasileiro professor Warwick E. Kerr para avaliar o tema. Ele viajou à África em 1956 e, após constatar a alta produtividade das abelhas africanas *Apis mellifera scutellata*, decidiu introduzi-las no Brasil (SEBRAE, 2009b).
2. **Período de africanização dos apiários e das colônias na natureza** → Devido à liberação acidental das abelhas africanas que permaneciam em quarentena iniciou-se o cruzamento com as demais abelhas européias anteriormente introduzidas, formando-se um poli-híbrido. Esta etapa caracterizou-se principalmente pela série de acidentes ocorridos devido à elevada agressividade dessas abelhas. Muitos apicultores abandonaram suas atividades, e ocorreu um verdadeiro caos na apicultura. A dependência de material importado era absoluta. O associativismo era inexistente, e este período culminou na criação da Confederação Brasileira de Apicultura, que, em 1970, realizou o 1º Congresso Brasileiro de Apicultura, para discutir os sérios problemas da apicultura nacional (SEBRAE, 2009b).
3. **Período de recuperação e expansão** → Com a migração das abelhas africanizadas rumo ao Norte e Nordeste, os estados nordestinos passaram a se interessar pela apicultura, ocorrendo significativo aumento do número de apicultores. Destaca-se a política de incentivo apícola do Serviço Brasileiro de Apoio as Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), com programas de capacitação e apoio tecnológico prestados, especialmente na Região Nordeste. A flora da região nordestina é rica e pouco agricultável, o que significa que é isenta de agrotóxicos. A presença das abelhas africanizadas resistentes a doenças propiciam a esta região ampla produção melífera, particularmente de mel orgânico (SEBRAE, 2009b). Por esta razão, o Nordeste representa

hoje um dos maiores potenciais apícolas do Brasil (IBGE, 2005b). O Brasil figura no mercado apícola internacional como exportador de mel e própolis.

### **3.2 – Definição, características e classificação:**

O mel, o principal produto apícola, surge a partir da simbiose abelha-planta que fornece o néctar à abelha. Este alimento é definido como um produto de aspecto viscoso, aroma agradável e sabor doce cuja matéria-prima principal para a sua elaboração é o néctar (nos méis florais), podendo ser também elaborados a partir de exsudados de plantas ou excreção de afídios (méis de melato), que as abelhas recolhem e transformam através da adição enzimática e evaporação (CAMPOS *et al.*, 2003; MARCHINI, MORETI e OTSUK, 2005). As enzimas provêm das glândulas hipofaríngeas das abelhas, e conseqüentemente estão presentes em sua saliva (CRANE, 1980), sendo a transformação dos açúcares do néctar importante do ponto de vista humano devido à sua relevância na elaboração do mel (AL-QASSEMI e ROBINSON, 2003). Em essência, o néctar é recolhido pelas abelhas coletoras e alocado nas vesículas melíferas, onde recebe a adição enzimática mencionada, e no retorno para a colméia, ele é passado para outra abelha sofrendo nova adição antes de ser finalmente armazenado numa célula do favo (AL-QASSEMI e ROBINSON, 2003). Dentro deste grupo de enzimas destacam-se as diastases ( $\alpha$ -amilases), as invertases ( $\alpha$ -glicosidades) e a glicose oxidase (CRANE, 1980). A adição enzimática é fundamental para elaboração, maturação e na qualidade do produto final. Além da etapa de adição enzimática, há uma etapa subsequente de evaporação que ocorre no interior dos favos, na qual a temperatura da colméia é o parâmetro essencial para que o néctar atinja valores de umidade abaixo de 20%. Depois de sua deposição nos favos, a evaporação aumenta gradualmente o conteúdo de sólidos para aproximadamente 80% durante um período de três a quatro dias, e durante este estágio, a invertase secretada converte a sacarose em hexoses, gerando o espectro final de açúcares do mel (AL-QASSEMI e ROBINSON, 2003).

A quantidade de mel obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar, número de dias que as flores o secretam e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos e com a quantidade de flores da área (MARCHINI, MORETI e OTSUK, 2005).

A curiosidade científica sobre a origem dos produtos elaborados pelas abelhas, bem como avanços comerciais que buscam determinar a qualidade, fomentar pesquisas que usem o conhecimento da morfologia dos grãos de pólen são preciosas ferramentas de investigação. Os

grãos de pólen ocorrem invariavelmente nos méis. Enquanto as abelhas coletam o néctar, o pólen é engolido ocasionalmente por elas e carregado até a colméia. Posteriormente, ele é armazenado nos favos juntamente com o néctar e está presente no produto final (BARTH, 2004). Além disso, com frequência, grãos de pólen isolados entram no néctar via pêlos do corpo de uma abelha (CRANE, 1980).

Por este fato, a origem polínica é um importante critério na classificação de méis, ou seja, a descrição minuciosa desta origem é crucial. De uma forma global, existem diversos tipos de pólen que compõem os méis. Neste âmbito, existem três possibilidades de classificação, sendo denominados méis monoflorais os que apresentam origem polínica atribuída majoritariamente a uma única família, gênero ou espécie vegetal, os biflorais que apresentam origem polínica vinculada a duas origens e os pluriflorais que contêm pólen de distintas espécies. Os méis monoflorais são indubitavelmente os mais atrativos, e mantêm, sempre, as mesmas características físico-químicas e organolépticas, além de serem mais apreciados em termos comerciais. Em contrapartida, os méis pluriflorais contêm propriedades muito variáveis, devido à multiplicidade envolvida em sua origem polínica (BARTH, 2004).

Persano Oddo *et al.*, (1995) discorrem sobre as dificuldades associadas à classificação em relação à origem polínica, já que existe uma série contínua de possibilidades intermediárias entre os méis monoflorais e os poliflorais. Existem dezenas de variedades de méis que podem ser diferenciadas pela flora, pela localidade (ou região) ou época de colheita, ou ainda, segundo as técnicas de preparação. Rigorosamente, não existe mel monofloral, contudo, uma pequena quantidade de néctar de outras plantas melíferas não influi marcadamente no seu sabor e na sua cor onde predomine o néctar de uma única espécie de flores (BASTOS, 2002). Baseado neste fato, em áreas onde se pratica agricultura em larga escala e em formações geológicas de grande porte, com grandes áreas homogêneas de vegetação natural, existe pouca dúvida em relação à origem polínica (CRANE, 1980).

A composição deste alimento varia notavelmente de acordo com a origem polínica, com a flora visitada e com as condições climáticas e edafológicas da região onde foi produzido (KOMATSU, MARCHINI e MORETI, 2002; SODRÉ *et al.*, 2003).

O componente dominante dos néctares são glicídios, e enquanto alguns néctares contêm principalmente sacarose, outros têm seu conteúdo restrito a glicose e frutose (CRANE, 1975).

Além destes aspectos, a sua composição também varia com a localização geográfica, presença de insetos sugadores e tipos de abelhas produtoras, sendo os principais gêneros de abelhas melíferas o gênero *Apis* e o gênero *Melipona*. O mel é proveniente das abelhas e

algumas vespas, porém devido a sua domesticação antiga e por ser originária dos principais países consumidores, a abelha *Apis mellifera* L. é a espécie considerada a principal produtora, apesar da diversidade de espécies de abelhas existentes e que produzem mel de boa qualidade, como as abelhas sem ferrão das tribos *Meliponini* e *Trigonini* (ALVES *et al.*, 2005).

Considera-se o mel um importante indicativo de poluição ambiental. As abelhas da espécie *Apis mellifera* L. e seus produtos têm sido usados para monitoramento da distribuição e impacto de vários poluentes incluindo elementos traço, metais pesados, radionuclídeos e pesticidas (PONIKVAR, SNAJDER e SEDEJ, 2005).

Além dos aspectos citados, a classificação deste alimento segundo distintos parâmetros é essencial para que se definam de forma objetiva as diretrizes de qualidade e regras para a comercialização dos tipos de produtos, além do direcionamento do processamento.

A Instrução Normativa nº11/2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o classifica segundo vários critérios. Quanto a sua origem o mel floral é classificado como mel monofloral ou polifloral, ou como mel de melato. Em termos de processamento, ele é classificado como escorrido, prensado ou centrifugado; e quanto a sua apresentação, é classificado em mel, mel em favos, mel com pedaços de favos, mel cristalizado, cremoso ou filtrado (BRASIL, 2000).

### **3.3 - Mel como alimento e medicamento:**

Usa-se o mel como ingrediente em alimentos ou como constituintes de nutracêuticos, medicamentos e cosméticos (HOSNY, EL-GHANI e NADIR, 2009). Como alimento, é comum o consumo em seu estado natural, seja ele líquido, cristalizado ou nos favos, sendo um importante alimento energético empregado em ingredientes de centenas de alimentos fabricados, principalmente produtos a base de cereais, por sua doçura, cor, flavor, caramelização e viscosidade (LA GRANGE e SANDERS, 1988). Ele é usado em condimentos, temperos para saladas e outros tipos de molho, nas indústrias de laticínios, carnes, bebidas, “snacks” e doces (MATSUDA e SABATO, 2004), além de produtos confeitados. Na indústria de bebidas não-alcoólicas o seu uso é recente e se expandiu na década de 90 (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). Também se usa este alimento como suplemento alimentar, na terapia médica e como alimento natural (AZEREDO *et al.*, 2003). Quando ele é empregado informalmente como medicamento, pode ser ingerido na sua forma convencional ou incorporado em várias receitas culinárias de cunho médico popular, e

avaliando-se a utilização e os aspectos farmacológicos referentes ao mel, considera-se a sua aplicação como medicamento antigo para o tratamento de feridas infectadas o qual foi recentemente redescoberto pela profissão médica, particularmente quando os agentes terapêuticos da medicina moderna falham (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). Molan (1992) descreve a sua efetividade em limpeza rápida de feridas infectadas, além da ação ativa na cicatrização. Outra discussão interessante se baseia na atribuição da atividade antimicrobiana a este alimento. O principal aspecto relacionado a esta atividade foi o efeito osmótico, já que ele é uma solução concentrada de açúcares (TOVEY, 1991), e esta observação o vinculou a uma potencial ação antimicrobiana. Estudos (BOGDANOV, 1997; MOLAN, 1992) se focaram na identificação e na ratificação desta atividade, e constataram que a atividade antimicrobiana não deve ser vinculada somente à alta concentração de açúcares, mas também a produção de peróxido de hidrogênio, um composto gerado pelo sistema enzimático glicose oxidase. (MOLAN, 1992). Posteriormente, foram descobertos outros agentes antimicrobianos não-peroxídicos como substâncias fitoquímicas incluindo ácidos fenólicos e flavonóides (WESTON, 2000). Assim, a atividade individual ou sinérgica destes fatores desempenha um papel no caráter antimicrobiano (IURLINA *et al.*, 2009).

Neste contexto, a atividade e a produção de substâncias antimicrobianas dependem de muitas características anteriormente abordadas para as características dos méis.

Aplica-se o mel na etno-medicina desde a antiguidade, e atualmente pode-se usá-lo no tratamento de queimaduras, desordens gástricas, asma, ferimentos infectados, ulcerações cutâneas e catarata (CASTALDO e CAPASSO, 2002). Outro uso difundido se observa em entrepostos farmacêuticos, nos compostos de mel, no qual o referido alimento é misturado com elementos diversos como ervas e própolis, com intuito de utilização farmacológica como agente antitussígeno e expectorante, contudo, não existem estudos que mostrem o impacto na qualidade de méis quando submetido à elaboração destes compostos, nem estudos sobre a manutenção das propriedades farmacológicas dos componentes de tais formulações. Portanto, novas tecnologias e usos inovadores deste alimento expandem as oportunidades de mercado (SNOWDON e CLIVER, 1996), gerando novas fontes e agregando maior valor ao produto.

### **3.4 - Composição nutricional e funcionalidade:**

Define-se o mel como uma das mais complexas misturas de carboidratos e de outros constituintes minoritários produzidos na natureza (OJEDA DE RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Ele é descrito por Moreira e De Maria (2001) como uma solução concentrada destes dois

monossacarídeos. De acordo com Finola, Lasagno e Marioli (2007) os monossacarídeos constituem a maior parte dos açúcares existentes, variando de 85% a 95% da totalidade da composição de glicídios deste alimento, contudo, segundo outros autores este teor é de aproximadamente 70% (BARTH *et al.*, 2005). A alta disponibilidade de hexoses faz com que este alimento seja fonte rápida de energia, uma vez que elas são prontamente absorvidas pelo organismo. Tal alimento apresenta um teor limitado de sacarose, que normalmente não ultrapassa 10%, tendo teores elevados deste glicídio quando extraído dos favos no estágio de maturação inadequado (CRANE, 1980). Segundo Moreira e De Maria (2001) os méis ainda possuem uma extensa gama de dissacarídeos como celobiose, maltose, gentiobiose, isomaltose, dentre outros e trissacarídeos como a centose, a rafinose, a erlose e a isomaltotriose, e outros oligossacarídeos. Por esta riqueza glicídica e energética, as abelhas utilizam parte desse mel para a própria alimentação e o restante é armazenado em quantidades consideráveis, para posterior abastecimento da prole num eventual período de escassez (BERA e ALMEIDA-MURADIAN, 2007). Ele é um alimento de fácil digestão e assimilação, constituindo-se uma fonte de energia que contribui para o equilíbrio dos processos biológicos por conter enzimas, vitaminas, ácidos, aminoácidos, substâncias bactericidas e aromáticas (KOMATSU, MARCHINI e MORETI, 2002).

A água é o segundo mais importante componente. Seu conteúdo é crítico, visto que afeta o armazenamento do produto e o seu conteúdo final depende de numerosos fatores ambientais durante a produção como condições climáticas, umidade no interior das colméias, além de depender de condições relacionadas ao néctar e ao processamento (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). A umidade é representativa alcançando percentuais entre 17 e 20% (MATSUDA e SABATO, 2004).

Dito alimento ainda tem uma composição química extremamente variada que contém quantidades de outros constituintes como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonóides, ácidos fenólicos, enzimas e outros compostos fitoquímicos (BERTONCELJ *et al.*, 2007; TURHAN *et al.*, 2007), e ainda contém pólen, cera e pigmentos (FALLICO *et al.*, 2004), vitaminas C e do complexo B (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico e ácido pantotênico) (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). Por conter uma gama de substâncias de interesse e seguindo as tendências atuais de consumo de produtos de origem natural com propriedades de prevenção de doenças além do seu papel nutricional, houve um aumento no interesse no mel (IURLINA *et al.*, 2009). A funcionalidade atribuída se justifica pela presença das classes de moléculas citadas anteriormente como ácidos fenólicos, flavonóides, vitaminas e compostos fitoquímicos que têm propriedades antioxidantes, de fato muitos autores

demonstraram que o mel serve como uma fonte de antioxidantes naturais que são efetivos nas reduções dos riscos de doenças cardíacas, câncer, deficiência do sistema imune, catarata e processos inflamatórios diversos (THE NATIONAL HONEY BOARD, 2003). Dentre as moléculas com poder antioxidante, verificam-se flavonóides como a crisina, a pinocembrina, a pinobanksina, a quercetina, o caempferol, a luteolina, a galangina, a apigenina, a hesperetina e a mirecetina, os ácidos fenólicos caféico, cumárico, ferúlico, elágico e clorogênico, carotenóides, ácido ascórbico, enzimas catalase e peroxidase e os produtos da reação de Maillard (BERTONCELJ *et al.*, 2007). A quantidade destes varia amplamente de acordo com as origens florais e geográficas que influenciam massivamente na composição de antioxidantes e condições de processamento, manipulação e armazenamento que possuem caráter minoritário em termos de influência (GHELDOF, WANG e ENGESETH, 2002). Deste modo, o conhecimento do perfil de moléculas como os flavonóides poderia representar uma poderosa ferramenta para uma melhor caracterização deste alimento, de acordo com sua origem botânica e geográfica (IURLINA *et al.*, 2009), e em essência da sua qualidade.

O efeito antioxidante é relevante, e estudos científicos provam a sua eficácia contra as reações de cunho oxidativo em alimentos causadas pela luz, calor e alguns metais, evitando o escurecimento enzimático em vegetais (CHEN *et al.*, 2000), oxidação lipídica em carnes (MCKIBBEN e ENGESETH, 2002) e inibindo o crescimento de patógenos e microrganismos deteriorantes em alimentos (MUNDO, PADILLA-ZAKOUR e WOROBO, 2004). Além da atividade antioxidante, é vinculada ao mel atividade prébiótica (MACEDO *et al.*, 2008).

### **3.5 – Legislação, importância econômica e adulterações:**

No Brasil, a importância da apicultura é consolidada pela multiplicidade de reservas florais, permitindo que milhares de toneladas de méis sejam produzidas atendendo assim os mercados mais exigentes (WIESE, 1993). Nosso país está colocado no *ranking* mundial como quinto produtor de mel, com uma apicultura considerada livre dos grandes problemas de sanidade (PACHECO, 2006), como resíduos de medicamentos e pesticidas.

A produção de méis alcançou a expressiva marca de 33.749 toneladas em 2005, um aumento de 51% quando comparado aos dados do ano de 2001 (IBGE, 2005b).

Dados recentes do ano de 2009 mostram que o setor superou a crise econômica mundial de 2008. O valor das exportações no ano passado aumentou mais de 50%, com preço recorde. A receita das exportações brasileiras em 2009 aumentou 51% em relação ao ano

anterior, alcançando a cifra de US\$ 65,79 milhões. O preço médio anual de US\$ 2,53 por quilo de mel foi o mais alto da história e o preço de US\$ 2,77/kg, em dezembro, foi recorde. (SEBRAE, 2009a).

Todavia, pela sua importância econômica, têm-se constatado fraudes por parte de produtores e comerciantes desonestos (ARAUCO *et al.*, 2008a, 2008b). Dentre as principais adulterações praticadas observa-se a adição de outros glicídios, frequentemente açúcares comerciais, como glicose, xarope de sacarose, melão, sacarose invertida (MORALES, CORZO e SANZ, 2008), sendo a forma mais usada a partir do caldo de cana-de-açúcar (SWALLOW e LOW, 1994). A aparência colorimétrica pode ser mudada por adição de iodo e a viscosidade alterada pela adição de aditivos químicos. As adulterações são frequentes, e são mais intensas pela baixa disponibilidade em algumas épocas do ano e pelo seu preço elevado (SIVAKESAVA e IRUDAYARAJ, 2002). Dentro desta temática, à medida que foram ocorrendo adulterações, métodos analíticos foram se desenvolvendo para detectá-las (ARAUCO *et al.*, 2008a, 2008b). Por isso, para garantir a autenticidade e o controle de qualidade, têm-se a necessidade de desempenhar extensivas análises de composição de méis (LIANG *et al.*, 2009). Observa-se nos dias atuais em destaque métodos recentes que empregam espectroscopia (SIVAKESAVA e IRUDAYARAJ, 2002), avaliações isotópicas de carbono e nitrogênio (ARAUCO *et al.*, 2008a, 2008b; ROSSI *et al.*, 1999) e detecção de marcadores químicos na determinação da qualidade (MONTILLA *et al.*, 2006) que são promissores como alternativas futuras frente aos métodos analíticos tradicionais.

Apesar de tal relevância econômica, os aspectos legislativos relacionados ao mel são tardios e somente a partir de 1978 teve o início o processo de criação da legislação que resguardaria a sua qualidade. A resolução nº12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) (BRASIL, 1978) que define o conjunto de características gerais, organolépticas, físico-químicas, microbiológicas, microscópicas e aspectos ligados a rotulagem. Em termos de características gerais, o mel não pode conter substâncias estranhas à sua composição normal, nem ser adicionados de corretivos de acidez, corantes, aromatizantes, espessantes, conservantes e edulcorantes de qualquer natureza (BRASIL, 1978).

Em virtude do aumento da representatividade da apicultura em termos econômicos houve a necessidade da melhoria dos aspectos legislativos para que o Brasil se fortificasse dentro do contexto mundial. Baseado em tal panorama, foi elaborada a Instrução Normativa nº11 de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que tem como referências as normas do “Codex Alimentarius Commission” (CAC), da “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) e das resoluções GMC nº80/96 e GMC nº36/93 do

MERCOSUL. Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou o Informe Técnico nº37 no ano de 2008 que afirma que não se deve administrar mel a crianças de até um ano de idade (ANVISA, 2008).

### 3.6 - Produção e processamento:

O mel comparado a outros tipos de produtos apícolas é o mais conhecido pela população, sendo o produto de mais fácil obtenção. O apicultor deve estar atento para manter a sua originalidade. A sua produção começa com a coleta do néctar e do pólen das flores (Figura 1-A), que é sugado pelas abelhas e passado pelo esôfago, tórax, até chegar ao abdômen, sendo depositado no estômago. Quando retornam a colméia, as abelhas o armazenam nos favos que são recobertos com uma fina camada de cera que é removida quando elas se alimentam deste produto (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). A seguir são mostrados os equipamentos que se usam (Figura 2) e um mosaico que ilustra as etapas do processamento (Figura 1).



**FIGURA 1: Etapas do processamento de méis.**  
**FONTE:** <[http://en.wikipedia.org/wiki/Bee\\_keeping](http://en.wikipedia.org/wiki/Bee_keeping)>.



**FIGURA 2: Equipamentos de proteção individual e máquinas envolvidas no processamento de méis.**  
**FONTE:** <<http://www.colmeias.com.br/index.php?src=colmeias/produtos>>.

A primeira etapa do processamento é sua coleta da colméia através do uso de vestimenta apropriada (Figura 1-B), com o auxílio do fumegador que afasta as abelhas das telas que contêm os favos. Eles são então “desoperculados” (Figura 1-C/D). Posteriormente, a tela é colocada em uma centrífuga (Figura 1-E) que o extrairá escorrendo-o. Após a extração, há a filtração (Figura 1-F) para retirar resquícios de cera dos favos “desoperculados” e outras sujidades, e a última etapa é o envase em recipiente estéril (Figura 1-G).

De fato, o processamento é constituído por múltiplas etapas que constituem pontos críticos de controle, nas quais a contaminação microbiana é um perigo proeminente, de modo que se deve seguir de forma rigorosa as boas práticas apícolas e os preceitos da legislação referentes à manipulação de alimentos. A higiene do indivíduo que faz a coleta, a desinfecção dos utensílios e uso dos equipamentos de proteção individual higienizados ou estéreis (Figura 2) são cruciais para que o produto permaneça com a sua segurança alimentar resguardada.

Além destes pontos críticos de controle, não é recomendado o aquecimento do mel durante a extração com temperaturas elevadas. Tal propósito é empregado com intuito de reduzir a viscosidade facilitando a etapa de filtração, prevenindo a cristalização, a fermentação e para eliminação de microrganismos contaminantes. Submeter o mel a altas temperaturas é extremamente prejudicial, pois gera produtos como o 5-hidroximetilfurfural (TOSI *et al.*, 2002; TURHAN *et al.*, 2007).

Devido a aspectos comerciais, méis frequentemente ficam armazenados por um ano antes do seu consumo. Durante o período de armazenamento, muitas mudanças que

influenciam positiva ou negativamente nos parâmetros nutricionais e sensoriais ocorrem (APARNA e RAJALAKSHMI, 1999). Felizmente, nos últimos anos pesquisadores direcionaram a sua atenção para as mudanças que acontecem durante longos períodos de armazenamento em temperaturas próximas a temperatura ambiente (GONZALES, BURIN e DEL PILAR BUERA, 1999), e quando estes são submetidos a condições diversas durante o processamento e armazenamento (CAVIA *et al.*, 2008; FALLICO *et al.*, 2004; JIMÉNEZ *et al.*, 1994; TOSI *et al.*, 2002; TOSI *et al.*, 2008; TURHAN *et al.*, 2007). O aumento do conhecimento nesta área é vital para o desenvolvimento de países tropicais como o Brasil. Nestes, as mudanças que ocorrem durante o seu armazenamento são mais importantes, devido às altas temperaturas médias. A compreensão destas modificações é relevante para o desenvolvimento da qualidade e da competitividade brasileira no mercado internacional (MOREIRA *et al.*, 2007).

### **3.7 - Parâmetros físico-químicos:**

Os principais parâmetros físico-químicos do mel são umidade, higroscopicidade, viscosidade, pH, acidez livre, minerais, proteínas, atividade diastásica e conteúdo de 5-hidroximetilfurfural.

A determinação de umidade em alimentos é normalmente considerada um procedimento analítico simples (CANO, FELSNER e BRUNS, 2007). No entanto, esta determinação envolve muitas complexidades, e os métodos existentes para a sua avaliação são raramente absolutos (CANO, FELSNER e BRUNS, 2007). De um ponto de vista econômico, a determinação rápida e confiável deste parâmetro físico-químico é imprescindível (ISENGARD e SCHULTEIB, 2001). O conteúdo de água é um parâmetro de qualidade muito importante em praticamente todos os produtos alimentícios, bem como em seus ingredientes. Ele é muito importante, se, não for uma influência decisiva na qualidade e especialmente na vida de prateleira de praticamente todo material de origem (ABRAMOVIC *et al.*, 2008). Na indústria melífera, o conteúdo de água é o principal fator com respeito a alterações por fermentação (CAVIA *et al.*, 2002). Valores de umidade abaixo de 20% são considerados adequados para assegurar a ausência de fermentação (WELKE *et al.*, 2008), visto que microrganismos osmofílicos provocam a sua fermentação em amostras com alta umidade.

A umidade é influenciada pela origem botânica, por condições climáticas e geográficas ou pela colheita antes de sua completa maturidade (NANDA *et al.*, 2003). De acordo com Terrab *et al.*, (2004), a umidade é uma das características mais relevantes, pois

influencia na viscosidade, peso específico, na maturidade, na cristalização, no sabor e na conservação deste alimento. Além disso, após a extração, a umidade muda de acordo com a estocagem devido à transferência de água (ZAMORA, CHIRIFE e ROLDÁN, 2006).

Diversos autores discutem a utilização da atividade de água como o melhor parâmetro para avaliação da possibilidade de desenvolvimento de microrganismos fermentativos em méis (CHIRIFE, ZAMORA e MOTTO, 2006). Segundo Franco e Landgraf (2005) a sua atividade de água se situa entre 0,54 e 0,75, contudo outros autores mencionam valores entre 0,5 e 0,62 (CHIRIFE, ZAMORA e MOTTO, 2006; IURLINA e FRITZ, 2005).

Dentro deste dilema, Chirife, Zamora e Motto, (2006) propuseram estudos que buscavam a obtenção de uma relação matemática entre a umidade e a atividade de água em méis. Os resultados observados mostram que há uma relação que tende a linearidade entre estes dois parâmetros físico-químicos. Os valores de coeficiente de correlação estão acima de 0,8. Cavia *et al.*, (2004) constataram um comportamento semelhante. Portanto, a umidade pode ser usada como um parâmetro fortemente associado à atividade de água neste alimento.

A higroscopicidade descreve a habilidade do mel absorver e reter umidade oriunda do ambiente. Méis dentro da normalidade apresentam teores de umidade menores ou iguais a 20% e absorverão umidade do ar quando esta apresentar valores superiores a 60% (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007).

A viscosidade do mel é governada por cadeias moleculares longas de açúcares. Ela é um parâmetro técnico importante durante o seu processamento porque há uma redução da sua fluidez ao longo da cadeia de processamento, extração, filtração e envase. A tensão superficial varia com sua origem, e provavelmente, devido a substâncias coloidais presentes nesta matriz. A alta viscosidade e a tensão superficial são responsáveis pela espuma eventualmente apresentada (OLAITAN, ADELEKE, OLA, 2007) e a temperatura desempenha papel significativo na sua viscosidade (MATSUDA e SABATO, 2004).

O pH é um parâmetro físico-químico associado ao desenvolvimento microbiano em qualquer alimento. No caso específico dos méis, a faixa de pH apresentada por tal alimento e constatada por diversos autores varia, mas geralmente o pH está localizado entre 3,3 e 4,7. Tais valores de pH impedem o desenvolvimento de microrganismos que necessitam de valores de pH neutros ou básicos, limitando significativamente o espectro de microrganismos potencialmente contaminantes. Embora o pH não seja indicado atualmente como análise obrigatória no controle de qualidade de méis brasileiros, mostra-se útil como variável auxiliar para avaliação da qualidade, pois, é um parâmetro de importância na sua extração e no seu armazenamento (CORBELLA e COZZOLINO, 2006). Esta propriedade físico-química

depende dos seus ácidos ionizados, bem como de seus elementos minerais e influencia na atividade enzimática e textura, entre outras propriedades (ESTUPIÑÁN *et al.*, 1998). A influência do pH na textura, na estabilidade e na vida de prateleira do mel é importante, visto que valores alterados de pH indicam fermentação ou adulterações (TERRAB *et al.*, 2004).

A acidez livre deve-se a diversos fatores como a variação dos ácidos orgânicos causadas pelas diversas fontes de néctar, a atividade enzimática da glicose-oxidase que origina o ácido glicônico, a ação de bactérias durante a sua maturação e os minerais presentes em sua composição que influenciam a textura e estabilidade do produto (TERRAB *et al.*, 2004). Este parâmetro é principalmente atribuído aos de ácidos orgânicos que se apresentam em quantidade de até 0,5% (CAVIA *et al.*, 2006), e é resultado da presença particularmente do ácido D-glicônico, em balanço com a sua lactona (éster interno) e alguns íons inorgânicos como fosfato, cloreto e sulfato, cujos ácidos correspondentes compõe este alimento. (AJLOUNI e SUJIRAPINYOKUL, 2009). O ácido glicônico representa 70 a 90% dos ácidos orgânicos contidos, e é o produto da reação da D-glicose catalisada pela glicose oxidase (MOREIRA *et al.*, 2007) (Figura 3). Apesar da ampla representatividade deste ácido, outros ácidos orgânicos foram detectados como acético, benzóico, butírico, cítrico, isovalérico, láctico, maléico, málico, oxálico, fenilacético, propiônico, piroglutânico, succínico e valérico (JIMENEZ *et al.*, 1994).

Valores elevados de acidez livre indicam a fermentação dos açúcares por leveduras. Durante tal fermentação, a glicose e a frutose são convertidas em dióxido de carbono e álcoois, sendo esses últimos hidrolisados na presença de oxigênio e convertidos em ácidos (acético, principalmente), os quais contribuem para a elevação do nível de acidez livre (AJLOUNI e SUJIRAPINYOKUL, 2009), e a acidez livre é um parâmetro importante de qualidade por outros aspectos, uma vez que contribui amplamente para o sabor característico deste alimento (CRANE, 1980), além de influenciar na estabilidade, reações químicas e nas suas propriedades antibacterianas e antioxidantes (BOGDANOV, 1997).

Normalmente os méis contêm uma variedade de substâncias minerais e micronutrientes, e a quantidade absoluta destes varia entre 0,02 a 1,0% (LACHMAN *et al.*, 2007). Dentre os minerais contidos, o potássio é o mais abundante, presente na proporção de um terço do conteúdo total de minerais. Além disso, este alimento contém outros minerais e elementos traços como: cálcio, magnésio, sódio, cobre, ferro, manganês, enxofre, cromo, chumbo, zinco, cádmio, níquel, fósforo e nitrogênio (BOGDANOV *et al.*, 2007), sendo o teor de nitrogênio associado às enzimas originárias das secreções salivares das abelhas (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007).

Diversos estudos avaliam possíveis fatores que influenciam na quantidade de minerais e elementos traço. Dentro destes fatores se destacam a origem botânica (GONZALEZ-MIRET *et al.*, 2005) e a origem geográfica. Além deste aspecto, se usam com frequência amostras como indicadores de contaminação por metais pesados, e neste contexto, chumbo, cádmio são os elementos traços mais relevantes, e são oriundos de fontes antropogênicas. De fato, os aspectos botânicos, geográficos e ambientais têm influência no conteúdo de elementos traço, portanto há a necessidade de considerá-los (BOGDANOV *et al.*, 2007). Atualmente, observa-se um número crescente de estudos que se baseiam nos ensaios de condutividade elétrica para determinação do conteúdo de minerais como aspecto classificatório dos méis.

Estes autores estudaram o seu conteúdo de minerais, de origens botânicas diferentes e localizações diferenciadas e concluíram que todos os elementos traços vinham de fontes naturais (solo e plantas) e de fontes antropogênicas, bem como da deposição de pó e aerossóis para flores, néctares, para superfície das folhas ou para as abelhas, então eles afirmam que os fatores botânicos têm influência mais marcante no conteúdo de elementos traços. Este conteúdo está entre os componentes que afetam a cor dos méis, de modo que a coloração clara freqüentemente indica pouca matéria mineral e a coloração escura indica um conteúdo mineral mais proeminente, embora a cor não se modifique somente por este parâmetro (CRANE, 1980).

O mel apresenta proteínas em diminutas quantidades de 0,1 a 0,5% (JAGDISH e JOSEPH, 2004). Certamente quando se aborda a questão do conteúdo protéico, há uma associação com a quantidade e a variedade enzimática contidas neste alimento, e em termos de composição de aminoácidos, a prolina é o principal aminoácido encontrado, representando 80 a 90% da quantidade total (MOREIRA *et al.*, 2007). Em geral a importância dos aminoácidos é que eles podem fornecer “impressões digitais” que distinguem um tipo de mel de outros, e méis, por si, de substâncias sintéticas disfarçadas em méis (CRANE, 1980).

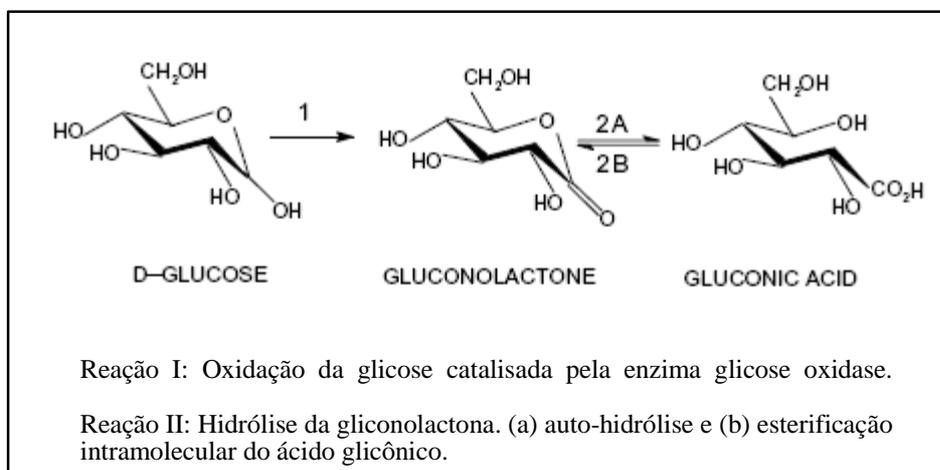
Este alimento também contém pequenas quantidades das enzimas diastases (alfa-amilases), invertases (amilo-glicosidases), glicose oxidase, catalase e fosfatase ácida (PERSANO ODDO, PIAZZA e PULCINI, 1999). Tendo em vista que estudos de períodos de frescor dos alimentos são particularmente importantes nos dias atuais, e dentro deste contexto, pelas enzimas serem reconhecidas como atributos ligados ao frescor e envelhecimento do mel (ALONSO-TORRE *et al.*, 2006), fundamenta-se a análise do seu conteúdo enzimático.

A adição enzimática depende de fatores como idade, dieta, estágio fisiológico das abelhas, bem como a resistência da colônia, temperatura e abundância de néctar (PERSANO ODDO, PIAZZA e PULCINI, 1999), além da própria origem polínica que interfere na

concentração e atividade enzimática. A importância da análise das enzimas consiste na avaliação de sua atividade frente a condições como processamento, armazenamento e aquecimento. Tendo em vista este embasamento, as principais enzimas usadas nesta avaliação são as diastases, pela sua elevada sensibilidade ao calor quando comparada as outras enzimas (CRANE, 1980). As diastases são consideradas juntamente com o conteúdo de 5-hidroximetilfurfural os principais parâmetros de qualidade deste alimento (NANDA *et al.*, 2003).

A origem das invertases são as secreções salivares e hipofaríngeas das abelhas coletoras (PERSANO ODDO, PIAZZA e PULCINI, 1999). Elas têm sua ação centrada na inversão da sacarose em glicose e frutose, o que aumenta o seu teor de açúcares redutores livres. No geral, o aumento gradual destes açúcares só será obtido através da permanência do produto na temperatura da colméia por um período referente à maturação do mel (CRANE, 1980).

Atribui-se a glicose oxidase a conversão de glicose em ácido glicônico que é o ácido orgânico majoritariamente presente (Figura 3). Além da geração de ácido glicônico, esta reação gera outro produto importante, o peróxido de hidrogênio.



**FIGURA 3: Formação do ácido glicônico pela ação da enzima glicose oxidase**

**FONTE:** Moreira *et al.*, 2007 - Adaptada.

A enzima catalase, que destrói o peróxido de hidrogênio se origina do pólen. Sabendo que a glicose oxidase provém da saliva da abelha, nota-se que seus níveis não variam de forma marcante, uma vez que o controle de maturação do mel é também modulado pelas abelhas. Por outro lado, pela catalase se originar do pólen, o nível desta irá determinar

efetivamente a quantidade de peróxido, e dependerá da quantidade de pólen coletada pelas abelhas, da origem floral do mesmo e também da atividade desta enzima (WESTON, 2000).

A fosfatase ácida é uma hidrolase que gera fosfatos inorgânicos de fosfatos orgânicos e está presente principalmente no pólen, embora também se apresente como componente do néctar. Apesar do fato desta enzima apresentar baixa atividade e ser menos resistente ao aquecimento e armazenamento que as enzimas citadas anteriormente, a sua determinação é interessante porque esta aferência se relaciona com a deterioração do mel por fermentação (ALONSO-TORRE *et al.*, 2006), e os mencionados autores relataram que há um aumento do “pool” destas enzimas especialmente durante o crescimento exponencial das leveduras fermentativas, então a fosfatase ácida pode ser usada no futuro para avaliar fermentações.

Outro parâmetro físico-químico crucial para a qualidade de méis é o 5-hidroximetilfurfural (HMF). Ele é o mais importante aldeído furânico formado, uma vez que este alimento oferece condições favoráveis a geração destes compostos, como altas concentrações de açúcares, baixos valores de pH e de atividade de água, assim como a presença de ácidos orgânicos (SPANNO *et al.*, 2009). O HMF provém de duas rotas principais: a reação de Maillard e a desidratação de hexoses em meio ácido (MONIEN *et al.*, 2009).

O mecanismo da reação de Maillard corresponde a uma série de reações resultado da condensação inicial entre um grupamento amino disponível que vem de moléculas de aminoácidos livres e uma fração contendo carbonilas, freqüentemente um açúcar redutor (CHAWLA, CHANDER e SHARMA, 2009). Esta reação é denominada escurecimento não-enzimático e gera compostos de alto peso molecular denominados melanoidinas que possuem nitrogênio e apresentam coloração escura (BOBBIO e BOBBIO, 1995). A reação de Maillard vem sendo alvo de estudos, sem que se tenha chegado à elucidação completa de seus mecanismos. De fato, é uma das principais reações que ocorrem durante o processamento térmico, cozimento e armazenamento de alimentos, e os produtos formados por esta têm impacto direto na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos (CHAWLA, CHANDER e SHARMA, 2009).

Segundo Bobbio e Bobbio (1995), existem alguns fatores que afetam a velocidade da reação de Maillard. A temperatura é um parâmetro que se elevado traz um incremento na velocidade destas reações. O pH também tem impacto importante, de modo que a sua variação favorecem a sua cinética. Outros fatores como atividade de água, natureza dos carboidratos e natureza dos aminoácidos envolvidos devem ser considerados, de modo que a mesma acontece de forma mais proeminente em meios concentrados, ou seja, em baixas atividades de água e altas concentrações de açúcares (COULTATE, 2002).

A formação do 5-hidroximetilfurfural (HMF) no mel e em outros alimentos, deve-se também à desidratação das hexoses em meio ácido (CRANE, 1980), especialmente em pH até 5 (FENNEMA, 1996). A presença de açúcares simples e água em meio ácido fornece condições favoráveis à formação desse composto furânico (NOZAL *et al.*, 2001).

Por isso, o HMF é certamente um dos produtos de degradação mais comuns em méis, indicando o seu “envelhecimento” (SILVA *et al.*, 2008). Geralmente está praticamente ausente em méis recém-colhidos e a sua concentração aumenta com o tempo, sendo considerado um importante indicador de qualidade (SPANNO *et al.*, 2009). Níveis elevados de HMF indicam alterações provocadas por armazenamento prolongado em condições inadequadas, superaquecimento ou adulterações (NOZAL *et al.*, 2001).

O aquecimento é muitas vezes empregado. Então, este favorece a formação do HMF. Além do tempo e temperatura de aquecimento, diferentes composições e valores de pH levam a distintos níveis de HMF (FALLICO *et al.*, 2004), e outros parâmetros físico-químicos como conteúdo de minerais, acidez total (AJLOUNI e SUJIRAPINYOKUL, 2009) são importantes.

Portanto, devido à multiplicidade de alimentos que normalmente o contém, tais moléculas são regularmente consumidas em nossa dieta (em leite, produtos panificados, caramelos, cereais matinais, café, cerveja, chocolate, frutas secas, sucos de frutas) (HUSOY *et al.*, 2009). No entanto, muito pouco foi elucidado sobre o metabolismo e biodisponibilidade do HMF, e a sua ingestão diária é estimada entre 30 e 150 mg (JANZOWSKI *et al.*, 2000). Levando em consideração que esta excede a de outros pro-genotóxicos, como acrilamida ou aminas heterocíclicas num fator de  $10^3$  a  $10^5$ , respectivamente, a conversão de uma fração diminuta para o metabólito reativo é relevante toxicologicamente (BAKHIYA *et al.*, 2009).

A presença de compostos potencialmente tóxicos como os aldeídos reativos em alimentos despertaram a atenção, visto que medidas de proteção ao consumidor e de controle de qualidade ganharam importância. Alguns estudos envolvendo tal temática demonstram que o HMF e seus derivados, 5-clorometilfurfural (CMF) e 5-sulfoximetilfurfural (SMF), têm apresentado atividade citotóxica, genotóxica, mutagênica e carcinogênica (TEIXIDÓ *et al.*, 2006). Além disso, mais de 20 aminas heterocíclicas complexas oriundas da reação de Maillard podem ter ações mutagênicas e carcinogênicas (COULTATE, 2002). Contudo, os resultados sobre o potencial mutagênico e carcinogênico do HMF são controversos (JANZOWSKI *et al.*, 2000), já que distintas observações foram feitas. Contudo, numerosos produtos químicos são mutagênicos ou carcinogênicos depois de ativação metabólica para intermediários quimicamente reativos. Apesar dos mecanismos de atividade tóxica do HMF permanecerem pouco elucidados, sabe-se que a principal via de bioativação metabólica é a

sulfonação (DURLING, BUSK e HELLMAN, 2009), que é executada pelas sulfotransferases gerando o sulfoximetilfurfural (SMF). De fato, Bakhiya *et al.*, (2009) constataram que o SMF induz grandes danos ao tecido renal, particularmente nos túbulos proximais, onde há necrose abundante. Esta constatação sugere que o risco associado com altas ingestões de HMF de fontes alimentares deve ser mais alto para humanos do que indicam os experimentos com roedores (HUSOY *et al.*, 2009). O SMF é um intermediário, muito instável, que pode interagir com nucleófilos celulares críticos como moléculas de DNA, RNA e proteínas resultando em danos estruturais que levam a toxicidade, pela formação de adutos com as moléculas de DNA, aumentando a incidência de carcinogênese e mutagênese (DURLING, BUSK e HELLMAN, 2009).

### 3.8 – Microbiologia dos méis:

A segurança alimentar é uma questão com importância crescente em saúde pública, e os governos de todo o mundo têm intensificado seus esforços visando melhorias (WHO, 2007). As bactérias patogênicas encontradas na água e/ou alimentos constituem uma das principais fontes de morbidade em nosso meio, e são responsáveis pelos numerosos casos de enterites, diarreias infantis e doenças epidêmicas (D'AGUILA *et al.*, 2000). Doenças alimentares são definidas como enfermidades, de natureza tóxica ou infecciosa, causadas por microrganismos que entram no corpo através da alimentação, e somente em 2005, se relatou 1,8 milhões de mortes ocasionadas por enfermidades diarreicas (WHO, 2007), causadas por distintos microrganismos que acometem diversos grupos populacionais com diferentes graus de severidade influenciados por múltiplos fatores (WHO, 2003).

As propriedades antimicrobianas dos méis são conhecidas pelos humanos há séculos e segundo Snowdon e Cliver, (1996) existem fatores nos quais são atribuídas tais propriedades (Anexo A).

Tysset, De Rautlin e De La Roy, (1974) sugerem que o baixo conteúdo protéico e a alta proporção carbono-nitrogênio não são propícios ao desenvolvimento de microrganismos, nem a sua acidez. Além disso, ele possui uma atividade de água baixa (0,54 a 0,75) quando comparada a atividade de água de outros alimentos. O anexo B mostra a atividade de água mínima para o desenvolvimento de alguns microrganismos.

Como ocorre com a atividade de água, o pH desfavorável provoca um aumento na fase lag da multiplicação microbiana (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Os anexos C e D

apresentam os valores de pH mínimos e máximos para a multiplicação de alguns microrganismos que contaminam méis.

A presença de altas concentrações de açúcares propicia um efeito osmótico que limita significativamente a possibilidade de desenvolvimento microbiano, devido ao arraste da água do meio intracelular para o mel fruto da alta pressão osmótica presente no sistema, deixando reduzidas moléculas de água disponíveis para os microrganismos (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007), enquanto a viscosidade opõe as correntes de circulação e limita a entrada de oxigênio (TYSSET, DE RAUTLIN e DE LA ROY, 1974).

Os méis contêm agentes antimicrobianos naturais como o peróxido de hidrogênio (MOLAN, 1992), moléculas fitoquímicas (ácidos fenólicos, terpenos, e pinocebrina), álcool benzílico e lisozimas (SNOWDON e CLIVER, 1996).

Apesar de conter diversas propriedades bacteriostáticas e bactericidas, este alimento não é considerado estéril, estando susceptível a contaminações (SILVA *et al.*, 2008) por fungos filamentosos, leveduras e bactérias (SOUZA *et al.*, 2008). Snowdon e Cliver, (1996) apresentam os gêneros associados à contaminação deste alimento (Tabela 1). Nota-se que há uma multiplicidade de gêneros de bactérias, fungos e leveduras, sendo que estes geralmente convergem para os microrganismos encontrados em abelhas e nas cercanias do mel.

**TABELA 1: Gêneros de microrganismos relatados em méis.**

<b>Bactérias</b>	<b>Reino Fungi</b>	
	<b>Leveduras</b>	<b>Bolores</b>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Ascospaera</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Atichia</i>
<i>Bacteridium</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Bettsia</i>
<i>Bacterium</i>	<i>Lipomyces</i>	<i>Cephalosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Nematospora</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Clostridium</i>	<i>Oosporidium</i>	<i>Coniothecium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Pichia</i>	<i>Hormiscium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Peronosporaceae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>Peyronelia</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Schwanniomyces</i>	<i>Triposporium</i>
<i>Proteus</i>	<i>Trichosporan</i>	<i>Uredianaceae</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Torula</i>	<i>Ustilaginaceae</i>
<i>Xanthomonas</i>	<i>Torulopsis</i>	
	<i>Zygosaccharomyces</i>	

**FONTE:** Snowdon e Cliver (1996).

As características microbiológicas estão relacionadas à sua qualidade e segurança. Os microrganismos de importância são leveduras, fungos filamentosos e bactérias esporuladas. Estes estão envolvidos em atividades de deterioração, produção de enzimas, toxinas, conversão metabólica e inibição de microrganismos competidores (SILVA *et al.*, 2008).

Existem duas distintas fontes de contaminação microbiana, as fontes primárias (antes da coleta) são difíceis de controlar e englobam fontes oriundas das condições edafoclimáticas (ar, solo e pó), fontes que advêm do néctar, pólen e aparelho digestivo das abelhas (SNOWDON e CLIVER, 1996). Então, tais microrganismos estão presentes com frequência e as fontes secundárias (depois da coleta) influenciam a qualidade de qualquer produto alimentício. Durante a extração e beneficiamento de méis, estas fontes se relacionam a manipulação incorreta, uso de materiais mal higienizados, locais inadequados de processamento pela incidência de vento, presença de insetos e permanência de animais domésticos (SILVA *et al.*, 2008). Hosny, El-Ghani e Nadir, (2009) apontam que as fontes secundárias são manipuladores, equipamentos, recipientes, animais e água. Possíveis rotas de transmissão para os méis extraídos incluem ar (no local de armazenamento ou durante o seu envase), manipuladores (infecções cutâneas, espirros, perdigotos e contaminação fecal), contaminação cruzada (atribuída a animais domésticos) e equipamentos (incluindo resíduos de alimentos ou água) (FINOLA, LASAGNO e MARIOLI, 2007). O caráter artesanal da apicultura é observado principalmente em apiários nos quais não são preconizadas as boas práticas durante o processamento ocasionando como principal implicação a contaminação do produto por microrganismos de fontes secundárias. Tendo em vista os possíveis microrganismos contaminantes nos méis, Snowdon e Cliver, (1996) abrangem ambas as fontes de contaminação subdividindo-as em quatro categorias:

1. Microrganismos comumente encontrados (algumas linhagens de leveduras e bactérias esporulantes).
2. Microrganismos que indicam qualidade sanitária (coliformes ou leveduras).
3. Microrganismos, que em determinadas condições podem causar doenças.
4. Microrganismos que causam doenças em abelhas.

*Actinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* e *Vagococcus* são gêneros de bactérias presentes em solos, no ar e na poeira. Leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Torula* são encontradas em açúcares com alta umidade (SNOWDON e CLIVER, 1996), e segundo Gilliam, Lorenz e Richardson, (1988) estão presentes na microflora intestinal de abelhas. Contudo, CRANE, (1980) afirma que o néctar, o corpo das abelhas, o solo do apiário, ar da colméia e os equipamentos são possíveis fontes de leveduras.

O pólen é considerado a fonte original de microrganismos no intestino das abelhas melíferas (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007). A microflora intestinal das abelhas contamina o mel com bactérias da família *Enterobacteriaceae*, fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* e, algumas vezes, por leveduras sendo também relatada a presença de bactérias pleomórficas variadas de imprecisa taxonomia (GILLIAM, LORENZ e RICHARDSON, 1988). O intestino das abelhas contém 1% de leveduras, 27% de bactérias Gram-positivas incluindo os gêneros *Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus* e *Clostridium* e 70% de bactérias Gram-negativas ou bactérias de Gram variáveis dos gêneros *Achromobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* (OLAITAN, ADELEKE e OLA, 2007).

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas é freqüentemente usada para indicar a qualidade sanitária de determinados alimentos. Esta importância se justifica pela grande maioria das bactérias patogênicas de origem alimentar fazerem parte deste grupo (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Também é relevante a contaminação por bactérias que atacam as crias de abelhas. Atualmente, na apicultura tem sido expressiva a contaminação de colméias por tais bactérias. A bactéria *Paenibacillus larvae* tem ganhado importância através de diversos estudos (GILLARD, CHARRIERE e BELLOY, 2008) que ratificam o seu potencial danoso porque ela invade e destrói as colméias pelo ataque as larvas . Ela é o agente causador da cria pútrida americana, doença mais difundida em abelhas no mundo (ALLIPI e REYNALDI, 2006).

Paralelamente, nos dias atuais, tem-se ampliado o interesse nas patologias ocasionadas por fungos. As patologias fúngicas ungueais ou onimicoses constituem uma das principais causas de enfermidades em nível mundial, e esta se torna importante, em vista de sua alta incidência, além de contribuir com a entrada para outros microrganismos, principalmente bactérias que poderão contaminar alimentos (SABIONI, HIROOKA e SOUZA, 1998).

Em relação aos diferentes fungos filamentosos, a sua distribuição é cosmopolita, ou seja, eles estão em todas as regiões do mundo e se desenvolvem numa grande variedade de

substratos e condições. Assim, os alimentos estão sujeitos à contaminação fúngica durante seu processamento, transporte, estocagem e em condições impróprias de manuseio (OGA, 2003).

Em alimentos com acidez alta e baixa atividade de água, como no caso dos méis, o crescimento de fungos filamentosos é um aspecto fundamental e provoca deterioração pela ação de uma variedade de enzimas. Além disso, muitos fungos filamentosos produzem metabólitos tóxicos quando se multiplicam e estes metabólitos secundários são micotoxinas e quando ingeridos causam alterações biológicas prejudiciais tanto no homem como em animais, sendo inclusive tóxicos para as abelhas, e, então eles têm potencial danoso às abelhas. Portanto, atualmente se considera a presença destes fungos um perigo à saúde pública (FRANCO e LANDGRAF, 2005). A produção de micotoxinas gerando a contaminação dos alimentos e a sua subsequente ingestão ocasionam na espécie humana sintomas com distintos graus de severidade que vão desde náuseas e dermatites até carcinomas hepáticos quando há a ingestão a longo prazo (OGA, 2003).

Deste modo, os fungos filamentosos também serão importantes microrganismos contaminantes em méis, principalmente os seguintes gêneros: *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. e *Cladosporium* spp. (PACHECO, 2006).

De fato, os fungos filamentosos também são danosos as abelhas e as suas crias. O fungo *Ascosphaera apis* causa a patologia cria giz que leva à morte de larvas e pupas, sendo esta doença relatada por estudos (ROCHA, BAGAGLI e FUNARI, 1998), assim como outras espécies de fungos do gênero *Aspergillus* causam a aspergilose, conhecida como cria pedra que gera morte de larvas e abelhas adultas. As principais espécies envolvidas são: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus niger*, todas com potencial para produzir micotoxinas (PACHECO, 2006).

Seguindo o caráter ubíquo dos fungos filamentosos, as leveduras responsáveis por processos fermentativos ocorrem naturalmente, com destaque para as do gênero *Saccharomyces* que são as mais difundidas, entretanto outros gêneros também são relatados (SNOWDON e CLIVER, 1996). Migdal *et al.*, (2000), relataram que as leveduras osmofílicas dos gêneros *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torula*, iniciam processos fermentativos, o que pode trazer alterações consideráveis nos parâmetros físico-químicos do produto. A fermentação é causada por ação das leveduras sobre a glicose e frutose resultando na formação de etanol e dióxido de carbono e o etanol na presença de oxigênio gera ácido acético e água, e como resultado, o produto fermentado apresenta gosto azedo (CHIRIFE, ZAMORA e MOTTO, 2006).

### 3.8.1. – Microrganismos específicos:

Dentro do amplo grupo de bactérias que contaminam os méis, selecionaram-se as espécies mais relevantes do ponto de vista clínico que, a seguir, serão abordadas.

#### 3.8.1.1 - *Bacillus cereus*:

De acordo com Cosentino *et al.*, (1997), as principais bactérias esporuladas, as mais resistentes ao calor e as de maior importância na microbiologia alimentar, pertencem aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. O envolvimento da bactéria *Bacillus cereus* e seu reconhecimento como agente etiológico de doenças de origem alimentar data de 40 anos (GHELARDI *et al.*, 2002).

O gênero *Bacillus* abrange um amplo leque de espécies de bastonetes Gram-positivos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, sendo formadores de endosporos (IURLINA *et al.*, 2006). Apresenta motilidade por possuir flagelos peritríquios, e seus esporos são centrais ou subterminais. De forma análoga a todas as bactérias do gênero *Bacillus*, o *Bacillus cereus* caracteriza-se metabolicamente por intensa atividade, já que produz enzimas que degradam diversos substratos orgânicos. As cepas de *Bacillus cereus* usam vários carboidratos como glicose, frutose, trealose, sacarose, maltose e lactose (FRANCO e LANDGRAF, 2005). A sua grande capacidade de multiplicação em diferentes substratos, versatilidade metabólica e formação de esporos, justificam o fato de esta bactéria ser um dos principais microrganismos deteriorantes em alimentos (IURLINA *et al.*, 2006). De fato, as espécies do gênero *Bacillus* se encontram numa ampla faixa de habitantes e possuem significância em nível clínico, ambiental e industrial (DROBNIEWSKI, 1993). Muitas destas são usualmente encontradas em solos, e freqüentemente contaminam alimentos, incluindo produtos laticínios, carnes, alimentos destinados a infantes, pratos elaborados com vegetais, condimentos e cereais (CHRISTIANSSON, BERTILSSON e SVENSSON, 1999), além de contaminar méis. A habilidade de formar esporos permite a sua sobrevivência durante alguns processos de tratamento de alimentos, e estes germinam a temperatura ambiente (IURLINA *et al.*, 2006). Os parâmetros físico-químicos que atribuem propriedades bacteriostáticas e bactericidas permitem que haja esporos, e a sua ocorrência reflete tolerância (IURLINA *et al.*, 2006).

Estes microrganismos têm o solo como o seu reservatório natural. Entretanto, devido à resistência de seus esporos, a bactéria pode ser isolada de uma grande variedade de pontos, estando amplamente distribuída na natureza (GHELARDI *et al.*, 2002) fato que reafirma que além do solo e do ar, outros veículos como as fezes das larvas de abelhas também contêm

estas espécies de microrganismos (TAORMINA, NIEMIRA e BEUCHAT, 2001), ou seja, a contaminação por *Bacillus cereus* provém de fontes primárias.

O *Bacillus cereus* é sem dúvida uma das espécies mais importantes na indústria de alimentos e destaca-se por sua capacidade de produzir toxinas, responsáveis por toxinfecções alimentares e enzimas extracelulares, que determinam o seu potencial de deterioração, ocasionando grandes prejuízos econômicos (COSENTINO *et al.*, 1997). Este microrganismo ubíquo é continuamente isolado de alimentos lácteos (REZENDE-LAGO *et al.*, 2007).

A maioria das linhagens de *Bacillus cereus* contém a capacidade de elaborar uma ampla faixa de metabólitos extracelulares durante a fase exponencial do crescimento. Estes metabólitos incluem toxinas denominadas fatores de virulência (RAJKOWSKI e BENNETT, 2003) que atribuem o dado grau de severidade durante o quadro patológico. As toxinas produzidas por *Bacillus cereus* são classificadas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fostatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e a toxina emética (REZENDE-LAGO *et al.*, 2007).

As patologias associadas à espécie *Bacillus cereus* são freqüentemente observadas quando o alimento possui uma alta carga contaminante inicial (superior a  $10^6$  células viáveis/g) e propicia a síntese de enterotoxinas associadas aos quadros clínicos (BAM, 2002a). *Bacillus cereus* causam duas formas de gastroenterites: a síndrome diarréica e a síndrome emética (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Segundo o Ministério da Saúde, durante o período de 1999 e setembro de 2008 foram notificados no Brasil 205 surtos atribuídos a *Bacillus cereus*. (BRASIL, 2008).

A contagem de *Bacillus cereus* em alimentos é feita por plaqueamento direto, método mais aplicado ou pelo método do número mais provável. No plaqueamento direto, o meio mais usado é o Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MPY) que combina a polimixina como agente seletivo e a gema de ovo e o manitol, como agentes diferenciais. A produção de colônias manitol negativas com uma forte reação com gema de ovo, e se caracteriza por um grande halo de precipitação, é típica dos bacilos do grupo do *Bacillus cereus*, que inclui *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus mycoides* (DA SILVA, JUNQUEIRA e SILVEIRA, 2001).

### 3.8.1.2 - *Clostridium botulinum*:

O *Clostridium botulinum* é uma espécie de bacilo Gram-positivo, que apresentam flagelos peritríquios e são formadores de esporos. São anaeróbios estritos, e produzem toxinas de natureza protéica. As cepas de *Clostridium botulinum* são classificadas em quatro grupos, designados I, II, III e IV, de acordo com o tipo de toxina produzida e sua atividade sobre proteínas e açúcares. As cepas sintetizam oito tipos de toxinas (FRANCO e LANDGRAF, 2005), sendo que cada uma produz um quadro imunologicamente diverso de botulismo, e as toxinas A, B e E causam a doença no homem (KAYSER *et al.*, 2005).

Esta espécie de microrganismo se distribui amplamente na natureza, sendo o solo e o ambiente aquático seu habitat principal, ou seja, advêm de fontes primárias. *Clostridium botulinum* do tipo A é o mais freqüente nos Estados Unidos e nos países da América Latina, como Argentina e Brasil, sendo o tipo B observado nos Estados Unidos e Europa e o tipo E em ambientes aquáticos, sobretudo no Japão e na Suécia (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Utiliza-se o termo botulismo para designar a intoxicação provocada pelo *Clostridium botulinum*. Tal verbete se origina da palavra *botulus* que significa salsicha em latim, devido ao envolvimento deste alimento nos primeiros casos de botulismo cientificamente comprovados, ocorridos na Europa Central no final do século XIX (FRANCO e LANDGRAF, 2005). O botulismo é definido como uma enfermidade neurológica severa causada pela neurotoxina botulínica que afeta humanos e uma variedade de animais (RALL *et al.*, 2003).

Atualmente, três formas de botulismo são conhecidas: o botulismo clássico ou alimentar, correspondente à intoxicação causada por ingestão alimentar com neurotoxinas, botulismo de lesões que é uma doença infecciosa causada pela proliferação e conseqüente liberação de toxinas em lesões infectadas e o botulismo infantil, inicialmente descrito em 1976, que também é uma doença causada pela ingestão de esporos e subseqüente germinação, multiplicação e toxigênese no intestino de crianças de tenra idade (FRANCIOSA, AURELI e SCHECHTER, 2003), representa um risco à saúde de infantes que não dispõe do sistema imunológico totalmente desenvolvido (SOUZA *et al.*, 2008).

O botulismo alimentar é um tipo severo de intoxicação pela ingestão da neurotoxina produzida por estes microrganismos. A neurotoxina botulínica é termolábil e pode ser destruída se o alimento for aquecido a 80°C por 10 minutos. A incidência desta doença é baixa, mas a enfermidade é considerada preocupante, posto que possui uma alta taxa de mortalidade, se não tratada imediata e apropriadamente (BAM, 2002b).

A fonte precisa de clostrídios é freqüentemente desconhecida. Geralmente, é de difícil identificação o veículo alimentar causador desta patologia, com a proeminente exceção do mel, alimento relacionado a diversos casos (FRANCIOSA, AURELI e SCHECHTER, 2003) e que é considerado um fator de risco dietético para crianças, podendo apresentar esporos de clostrídios dos tipos A e B (CENTORBI *et al.*, 1999).

Verifica-se à epidemiologia desta patologia em distintos países como Argentina, Japão, Itália e Estados Unidos (ARNON *et al.*, 1979; FENICIA *et al.*, 1993; TAKAHASHI *et al.*, 1988). Esta forma de botulismo não ocorre com características epidêmicas e é a mais freqüentemente notificada pelo Center of Disease Control (CDC) (RALL *et al.*, 2003), sendo a incidência notificada pelo CDC em 2008 deste tipo de botulismo superior a 50% (CDC, 2008).

O botulismo infantil causa constipação, déficit de atenção, letargia, dificuldade no ato de mamar e deglutição, choro pouco proeminente, fraqueza muscular generalizada e perda do controle da cabeça. Além disso, sintomas clássicos como secura na boca, dificuldade de deglutição e de controle da língua são sintomas característicos, culminando com paralisia flácida manifestada como hipotonia ou fraqueza são os mais evidentes (RALL *et al.*, 2003).

As neurotoxinas botulínicas são proteínas extremamente potentes (KAYSER *et al.*, 2005). O mecanismo de ação se relaciona com a característica de metaloproteases que catalisam a proteólise dos componentes do aparato de neuroexocitose da placa motora, o que ocasiona paralisia flácida da musculatura (KAYSER *et al.*, 2005). Outro mecanismo de ação proposto por Nevas *et al.*, (2002) se baseia na ligação da toxina a membrana sináptica das terminações nervosas colinérgicas impedindo a liberação de acetilcolina para as sinapses parassimpáticas e junções neuromusculares. O botulismo é um problema importante de saúde pública no mundo. Estudos mostram a necessidade de mais pesquisa sobre o assunto (RALL, *et al.* 2003).

Segundo o Ministério da Saúde, a vigilância epidemiológica de botulismo no Brasil teve início oficial em 2002, no entanto, desde 1999 a Coordenação de Vigilância das Doenças de transmissão Hídrica e Alimentar (COVEH) realiza a vigilância desse agravo. Entre 1999 e setembro de 2008, foram notificados 105 casos suspeitos de botulismo, dentre os quais 39 foram confirmados: 37 de botulismo alimentar, um de botulismo por fermento e um de botulismo intestinal. A taxa de letalidade nesse período foi de 33,3% (BRASIL, 2009).

### 3.8.1.3 - *Staphylococcus aureus*:

É elevado o envolvimento do *Staphylococcus aureus* em casos ou surtos de intoxicação ocasionados pela ingestão alimentar contendo enterotoxinas, e surtos atribuídos a contaminação com estafilococos ocorreram em diversas localidades ao longo dos séculos XIX e XX (BENNETT e MONDAY, 2003).

Atualmente, a intoxicação causada por estes é um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar em todo o mundo (SILVA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2003b). Os principais alimentos relacionados são os queijos (REIBNITZ, TAVARES e GARCÍA, 1998; SABIONI, HIROOKA e DE SOUZA, 1988), carnes (NETO, SILVA e STAMFORD, 2002; PELISSER *et al.*, 2009), além de produtos extensamente manipulados.

Segundo o Ministério da Saúde, foram relatados entre o período de 1999 a 2008, 600 surtos associados a este microrganismo, 20,2% do total de surtos notificados em nosso país. (BRASIL, 2008).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Staphylococcaceae (FRANCO e LANDGRAF, 2005), imóveis, não esporulados, capsulados ou não, anaeróbios facultativos, e que visualizados em microscópio aparecem em pares, cadeias pequenas ou cachos (BAM, 2002c). Possuem metabolismo respiratório e fermentativo (BENNETT e MONDAY, 2003) e com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então produzem catalase (FRANCO e LANDGRAF, 2005), sendo classificadas como espécies catalase positivas. Além disso, os estafilococos utilizam uma variedade de carboidratos e requerem fontes de nitrogênio (BENNETT e MONDAY, 2003).

Dentre as espécies que fazem parte do gênero *Staphylococcus*, a espécie *Staphylococcus aureus* certamente é a que se atribui maior grau de relevância. Esta é capaz de produzir enzimas extracelulares, toxinas e outros componentes químicos, como fatores de patogenicidade e virulência entre eles as estafiloquinases, as hialuronidasas, as fosfatases, as coagulases e as hemolisinas, que totalizam pelo menos 34 tipos distintos de proteínas, e dentro deste grupo de metabólitos, dois são importantes na sua identificação, a coagulase, uma enzima solúvel que coagula o plasma e a termonuclease uma fosfodiesterase termoestável que cliva moléculas de ácido desoxiribonucléico (DNA) ou ácido ribonucléico (RNA) (BENNETT e MONDAY, 2003).

O crescimento e proliferação do *Staphylococcus aureus* em alimentos representa um risco a saúde do consumidor, considerando a produção de enterotoxinas. A razão primária para a sua busca e para sua identificação é a tentativa de rastrear se este microrganismo teve

como veículo algum ingrediente ou a própria contaminação pós-processamento (BENNETT e MONDAY, 2003), assim como fontes de contaminação secundárias que indicam práticas de higiene e manipulação inadequadas (REIBNITZ, TAVARES e GARCÍA, 1998).

O homem é o principal reservatório de *Staphylococcus aureus* e os percentuais de colonização variam de 60 a 70% (SANTOS, 2000). Santos, (2000) constatou que a frequência de portadores de *S.aureus* é alta e, tratando-se de indivíduos que manipulam alimentos, este fato constitui-se um elemento vital na cadeia epidemiológica da intoxicação alimentar estafilocócica, desde que estejam infectados com cepas produtoras de enterotoxinas. Santos, Aguillar e Takakura, (1990) descrevem a cavidade nasal e as mãos como os seus principais habitats no homem e, a partir destes focos, elas atingem o ar, água, solo ou superfícies e objetos que tenham contato com o alimento (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Além do homem, os animais domésticos também são portadores ou apresentam-se contaminados (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Baseado nestas constatações, a contaminação por *Staphylococcus aureus* em méis provém majoritariamente de fontes secundárias. A contaminação pós-processamento de alimentos é comum, devido ao contato humano com o alimento já processado ou exposição a superfícies inadequadamente sanitizadas. Então a sua contagem se relaciona com o controle de qualidade higiênico-sanitária do processo de produção (DA SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001).

A estafiloenterotoxiose ou estafiloenterotoxemia é o nome clínico dado a condição causada pela ingestão destas enterotoxinas (BAM, 2002c). Estas enterotoxinas são resistentes à ação de enzimas proteolíticas como a tripsina e a pepsina, o que torna possível a sua passagem íntegra ao longo do trato digestivo até o seu sítio de ação (BENNETT e MONDAY, 2003). A quantidade destas enterotoxinas requeridas para o estabelecimento dos sintomas típicos de intoxicação é muito reduzida, variando de 20 ng a 1 µg, correspondendo a um número de bactérias de  $10^5$ - $10^6$  UFC/g de alimento (BAM, 2002c).

As enterotoxinas apresentam diversos mecanismos de ação. A ação emética é a reação mais freqüente. Os sítios desta ação parecem localizar-se no intestino, e este estímulo é transferido através do nervo vago e simpático ao centro do vômito, que faz parte do sistema nervoso central (SNC). O centro do vômito induz a retroperistalsia provocando o vômito. A ação diarréica é o segundo sintoma mais comum. O mecanismo desta ação não está completamente elucidado, contudo acredita-se que a enterotoxina cause inflamação e irritação da mucosa gástrica e entérica, provocando assim o quadro diarréico (FRANCO e LANDGRAF, 2005). Mortes por toxinfecções por estafilococos são raras, embora estes casos possam ocorrer em idosos, crianças e pessoas severamente debilitadas (BAM, 2002c).

O período de incubação da doença varia de 30 minutos até 8 horas, porém, o início dos sintomas é rápido (2-6 horas) e são agudos, e como é uma enfermidade de curta duração e severidade variável, os indivíduos não necessitam de atendimento médico e os casos não são notificados (RODRIGUES *et al.*, 2004). Os sintomas mais comuns são náusea, vômitos, espasmos abdominais e diarreia. Nos casos mais severos, dores de cabeça, cãibras musculares, e mudanças transientes na pressão sanguínea ocorrem, além de presença de muco e sangue no vômito e nas fezes (RADDI, LEITE e MENDONÇA, 1988).

A contagem de *Staphylococcus aureus* é feita com dois objetivos diferentes, um relacionado com a saúde pública, para confirmar o seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar, e outro relacionado ao controle de qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção alimentar, condição em que *Staphylococcus aureus* serve como indicador de contaminação pós-processamento ou das condições de sanificação das superfícies destinadas ao contato com alimentos. De fato, o sucesso das análises depende da seleção de um método adequado tanto ao número de células presentes na amostra, como às condições de injúria impostas a estas, portanto alimentos envolvidos em surtos não exigem métodos tão sofisticados quanto os alimentos nos quais a espécie é usada como indicador de contaminação pós-processamento que apresenta tal bactéria em proporções mais diminutas (DA SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001).

#### 3.8.1.4 – *Salmonelas*:

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreendem bacilos Gram-negativos não produtores de esporos (HANES, 2003). As salmonelas são classificadas como anaeróbios facultativos, produtores de gases a partir da glicose e que são capazes de utilizar o citrato como fonte de carbono (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

As bactérias do gênero *Salmonella* são as principais causadoras de toxinfecções alimentares no mundo (HANES, 2003), inclusive no Brasil (FRANCO e LANDGRAF, 2005), e estão entre as mais prevalentes causadas por bactérias comunicadas nos Estados Unidos atualmente (HANES, 2003). Estas patologias acometem 3,84 milhões de americanos e custam bilhões de dólares quando se considera fatores como perda de produtividade e custos médicos anualmente (WHO, 2007). O número de casos notificados de Salmoneloses nos Estados Unidos durante o ano de 2006 foi de 45.808 (CDC, 2008).

Segundo o Ministério da Saúde, durante o período de 1999 a setembro de 2008 foram notificados no Brasil 1275 surtos associado a este microrganismo, representando o percentual de 42,9% do total de surtos relatados. (BRASIL, 2008).

Entre os animais, as aves, os suínos, os bovinos e os animais domésticos podem ser portadores (FRANCO e LANDGRAF, 2005). As principais vias de transmissão envolvem a transmissão de animais para humanos através dos alimentos ou transmissão entre humanos por via oral-fecal (HANES, 2003), caracterizando possíveis fontes secundárias de contaminação de méis, ou mesmo contaminações cruzadas.

Salmoneloses em humanos ocorrem em uma variedade de tipos, apresentando um amplo espectro clínico (HANES, 2003). Certamente a patologia de maior interesse é a enterocolite (ou salmonelose) causadas por diversas espécies de salmonelas não Thyphi. Ela se caracteriza por ligação das bactérias aos enterócitos presentes no íleo e no cólon. Há a invasão da mucosa induzida por proteínas presentes na sua superfície (KAYSER *et al.*, 2005). Após a invasão, as salmonelas alcançam a lâmina basal (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam e se restringem aquela localidade. A inflamação se relaciona com a liberação de prostaglandinas que são estimuladoras de adenilciclase e que resulta no aumento da secreção de água e eletrólitos, provocando a diarreia aquosa (FRANCO e LANDGRAF, 2005).

O quadro clínico caracteriza-se por sintomas que incluem diarreia, febre, dores abdominais e vômitos (FRANCO e LANDGRAF, 2005; HANES, 2003). Tipicamente, o período de incubação para o desenvolvimento do quadro é de 6 a 72 horas. O início súbito se caracteriza por dor abdominal, diarreia aquosa e ocasional presença de muco ou sangue nas fezes. Febre de 38-39°C é comum, sendo frequentes dores abdominais brandas ou severas. Casos sem complicações atingem o estágio agudo dentro de 48 horas, contudo a patologia ainda pode persistir durante 14 dias (HANES, 2003). Em crianças pequenas e recém-nascidas, a salmonelose pode ser bastante grave, já que *Salmonella* ocasionalmente atinge a corrente circulatória e provoca lesões em outros órgãos.

A técnica tradicional de detecção de *Salmonella* é um método clássico, desenvolvido com a finalidade de garantir a detecção mesmo em situações extremamente desfavoráveis, como no caso de alimentos com uma microbiota competidora muito maior do que a população de *Salmonella*, e/ou alimentos em que as células de *Salmonella* estão em número muito reduzido e/ou alimentos em que as células se encontrem com injúrias pelo processo de preservação (DA SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 2001).

### 3.8.1.5 - *Pseudomonas aeruginosa*:

A versatilidade bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa* e sua resistência a agentes antimicrobianos são fatores que têm determinado grande interesse no seu estudo. *Pseudomonas aeruginosa* tem o formato de bastonete reto, com 0,5 a 0,7 µm de diâmetro e 1,5 a 3,0 µm de comprimento. É um microrganismo Gram-negativo, flagelado, aeróbio e não fermentador de glicose, e degrada proteínas, carboidratos e gorduras (LINCOPAN e TRABULSI, 2004). Contudo, pode crescer em ambiente anaeróbio em presença de nitrato como aceptor final de elétrons, e também tem a capacidade de crescer em colônias com síntese de alginato. Agrupam-se em micro-colônias unidas por uma matriz exo-polissacarídea que propicia a formação de uma estrutura altamente hidrofóbica conferindo resistência à comunidade de bactérias (LINCOPAN e TRABULSI, 2004). Sua resistência a diferentes antimicrobianos pode ser intrínseca, devido à baixa permeabilidade de sua membrana e a capacidade de formar biofilme, ou adquirida pela associação com microrganismos. Devido à sua presença em uma multiplicidade ambiental, carrega plasmídeos e genes que lhe conferem multirresistência (MAIA *et al.*, 2009).

Tal microrganismo produz pigmentos, causando alterações nas características químicas e sensoriais, representando uma espécie comum em alimentos frescos, sejam de origem animal ou vegetal, e sua presença em níveis elevados no final do processamento resulta na redução da vida de prateleira de produtos, devido à produção de muco superficial, além de odores e sabores desagradáveis, sendo, portanto, seu estudo válido na indústria alimentícia (MAIA *et al.*, 2009).

Um importante veículo de transmissão desta é a água, já que a contaminam por diversas vias, seja na fonte ou processamento (SANT'ANA *et al.*, 2003). *P.aeruginosa* tem sido encontrada em águas minerais em muitos países. Sua presença indica contaminação devido à infiltração natural, matéria fecal, efluentes domésticos e agroindustriais ou falhas de higienização (IWERSEN *et al.*, 2009). Tal espécie se multiplica em águas com baixos teores de nutrientes, sobrevivendo durante longos períodos de tempo (LEGNANI *et al.*, 1999).

Desta forma, *Pseudomonas aeruginosa* é ubiqüitário da água e do solo (LINCOPAN e TRABULSI, 2004) e está difundida na natureza e no ambiente hospitalar, apresenta necessidade nutricional mínima e tolerância a condições físicas variadas (umidade, temperatura, pH), o que favorece sua sobrevivência em superfícies úmidas e secas por períodos prolongados. Tais microrganismos são reconhecidos como pertencentes à microbiota normal da superfície de plantas, pele do homem e animais e estão presentes em vegetais

(MAIA *et al.*, 2009). De acordo com Silva Júnior (1996) ela é a responsável por 12 % dos surtos de bacteremia causadas por bactérias Gram-negativas em cozinhas devido aos procedimentos de higienização de utensílios, ambientes e equipamentos não sanitizados adequadamente e a elevada resistência a antibióticos e anti-sépticos leves durante a higienização. Porém, a sua relevância nos dias atuais está em seu papel de patógeno oportunista (SANT'ANA *et al.*, 2003), e sua participação é resultante de suas mínimas necessidades nutricionais, resistência e a concomitante produção de uma série de substâncias que participam da patogenicidade da infecção (PELLEGRINO, 2002).

Devido à frequência com que está envolvido em infecções, representa um problema, especialmente, em pacientes hospitalizados, sendo um dos mais frequentes causadores de infecções hospitalares. O quadro clínico é grave, especialmente em pacientes imunosuprimidos ou infecções crônicas e em portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida, com queimaduras graves e câncer, alcançando índices de mortalidade de 50% (PETERSON, 2006). Portanto, é mais nocivo principalmente a indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos (SANT'ANA *et al.*, 2003). Isso é exacerbado quando esta tem acesso a sítios corporais normalmente estéreis, nos quais desencadeia infecções como no trato urinário, sistema respiratório, sítios cirúrgicos, queimaduras graves, dermatites, sendo associadas a casos de meningite, endocardites, bacteremias e septicemias graves (LINCOPAN e TRABULSI, 2004).

### 3.9 - Irradiação:

#### 3.9.1 - Introdução e histórico:

As elevadas perdas de alimentos em todo mundo, que atingem quase 1/3 da produção, têm preocupado muitos países. A busca incessante por métodos de conservação mais sofisticados e rápidos, que mantenham o alimento seguro e prolonguem seu tempo de vida comercial, faz com que pesquisadores invistam em pesquisas voltadas para o aperfeiçoamento de processos alternativos de conservação. Uma tecnologia, já amplamente testada, cuja eficiência é comprovada em várias aplicações e para diversos tipos de alimentos é a irradiação (VITAL, 2005 *apud* DE ALMEIDA, 2006). O mérito da irradiação, assim como em outros métodos de conservação, está em sua capacidade de destruir microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes nos alimentos (ORNELLAS *et al.*, 2006). Embora frequentemente designada uma nova tecnologia, a irradiação de alimentos não é recente. Josephson e Peterson, (1983) descrevem que a idéia de usar a radiação ionizante para melhorar a qualidade

e aumentar o tempo de prateleira de alimentos já provinha do final do século XIX. Os primeiros relatos acerca do uso da irradiação datam de 1905, ano no qual os Estados Unidos e na Inglaterra requereram as primeiras patentes, e estas tinham o objetivo de utilizá-las para eliminar bactérias presentes em alimentos (CCR, 2001).

Os primórdios da história dos alimentos irradiados (1890-1940) estão inseparavelmente ligados a física da radiação e ao desenvolvimento de sistemas e fontes que pudessem ter seu uso destinado a este propósito. O período seguinte (1940-1970) caracterizou-se por pesquisa e desenvolvimento intensivos que se sobrepõe com estudos extensivos sobre o caráter salutar destes alimentos (MOLINS, 2001). Nesta época, a irradiação entrou em franca expansão com programas como “Átomos para paz”, que surgiu após a Segunda Guerra Mundial. A partir do início da década de 50, foi lançada uma campanha mundial, para mostrar os usos benéficos da energia atômica. Através destes programas foram fomentadas pesquisas na área de irradiação e o Departamento Médico das Forças Armadas Americanas foi pioneiro (SENDRA *et al.*, 1996). A possibilidade de alimentos serem preservados por irradiação foi, portanto, reconhecida no início da década de 50, mas em despeito aos graus variáveis de aceitação das autoridades em muitos países permaneceu apenas um potencial (COULTATE, 2002).

A irradiação teve seu emprego regulamentado pelo “Food and Drug Administration” (FDA) em 1963 para alimentos destinados ao consumo humano (LAGUNAS-SOLAR, 1995) e posteriormente, a partir da década de 70, os eventos históricos relacionados à irradiação se ligam ao aspecto regulatório (MOLINS, 2001). Entre 1964 e 1997, a “World Health Organization” (WHO) acompanhou os resultados sobre irradiação de alimentos, coordenada pela “Food and Agriculture Organization” (FAO) e a “International Atomic Energy Agency” (IAEA), divulgados em 1964, 1969, 1976 e 1980 em reuniões com especialistas de diversos países avaliaram a comestibilidade destes alimentos, e em setembro de 1997 a WHO aprovou e recomendou a irradiação de alimentos em doses que não comprometam as suas características sensoriais. (DE ALMEIDA, 2006).

O anexo E exibe a ordem cronológica de um pequeno histórico mundial, em termos da irradiação de alimentos.

### 3.9.2 - Irradiação de alimentos no Brasil:

As primeiras pesquisas de irradiação alimentar foram feitas na década de 50, pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no estado de São Paulo (ORNELLAS *et*

*al.*, 2006). Em 1969, iniciou-se a irradiação alimentar pelo Exército Brasileiro, com uma parceria entre a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e o grupo Interministerial de Trabalho (MEx/MS/MA), elaborando a seguir o Plano Nacional de Irradiação Alimentar, com integração de laboratórios oficiais para execução, operação e análise (DE ALMEIDA, 2006). Posteriormente, as autoridades que tratam da regulamentação acerca de alimentos aprovaram-na em 1973 (BEHRENS *et al.*, 2009), e nas décadas de 80 e 90 novas regulamentações surgem com intuito de aumentar a sua utilização (ORNELLAS *et al.*, 2006). Um fato relevante na sua expansão ocorreu a partir de 1984 devido à proibição dos tratamentos quarentenários com agentes fumigantes (principalmente o brometo de metila), criando barreiras comerciais por parte dos países importadores (DIEHL, 1990), e impulsionando o emprego da irradiação. Mesmo com a obtenção da permissão de uso da irradiação para uma série de alimentos em 1985, os estudos focados em irradiação se restringiram quase que exclusivamente às instituições de pesquisa, uma vez que o país contava com um número restrito de especialistas (SANZ, 2004 *apud* ORNELLAS *et al.*, 2006). No ano de 2001, a regulamentação brasileira que dispõe sobre irradiação de alimentos foi revisada e estendida (BEHRENS *et al.*, 2009). Atualmente, a legislação brasileira segue as recomendações sugeridas pelo “Food and Agriculture Organization” (FAO), “International Atomic Energy Agency” (IAEA) e “Codex Alimentarius Commission” (CAC), além das recomendações do Grupo Consultor Internacional para Irradiação de Alimentos (ICGFI). Todas as normas para o emprego desta tecnologia estão descritas na Resolução nº 21 de 26 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001). Esta resolução aprova a irradiação com o propósito de desinfecção, redução da carga de microrganismos ou esterilização, sem causar perdas nutricionais, funcionais ou mudanças sensoriais ao alimento. Tal resolução é considerada uma das mais avançadas do mundo, visto que não estabelece quantitativamente limites de doses para este tratamento. Ela autoriza a irradiação desde que se use as fontes autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). Além disso, ela exige apenas que a dose mínima absorvida seja suficiente para alcançar a finalidade pretendida e a dose máxima seja inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais e/ou os atributos sensoriais do alimento, e afirma que os alimentos irradiados devem ser identificados com a inscrição “tratados pelo processo de irradiação” ou através do uso do símbolo universal de alimentos irradiados (Figura 4) que é denominado radura (BRASIL, 2001).



**FIGURA 4: Radura, símbolo universal de alimentos irradiados.**  
**FONTE:** <<http://uw-food-irradiation.engr.wisc.edu/images/radura.gif>>.

### 3.9.3 - Tendências e mercado:

Associado aos métodos tradicionais de tratamento e conservação de alimentos, o processo de irradiação está recebendo uma crescente atenção em todo o mundo (ICGFI, 1999). Atualmente, já se observa, por parte de algumas instituições, um crescente esforço na divulgação e no esclarecimento dos aspectos básicos desta técnica, abordando suas vantagens e o vasto potencial que representa em termos globais (DE ALMEIDA, 2006). A irradiação, através dos seus múltiplos usos, mostra-se comprovadamente como uma atraente opção para aumentar a oferta de alimentos mais saudáveis, duráveis e diversificados, capaz de contribuir para que um maior número de pessoas a nível mundial tenha acesso a um padrão nutricional mais adequado. Conseqüentemente, proporciona um aumento na produtividade social do homem, além de melhorar a competitividade no mercado internacional e ampliar a oferta de alimentos que anteriormente não estariam disponíveis para consumo.

Entretanto, a despeito de todos os benefícios atribuídos à irradiação de alimentos, ela permanece pouco utilizada não somente no Brasil, mas também em outros países (BEHRENS *et al.*, 2009), sendo pouco divulgada e restrita a produtos destinados a exportação (HERNANDES, VITAL e SABAA-SRUR, 2003). Deve-se ressaltar que apesar do crescente interesse industrial e científico e da ampliação do número de plantas de irradiação, esse método de conservação é alvo de muitos preconceitos e ainda carece de mais divulgação bem como de esforços multi-institucionais coordenados, visando à implantação de um plano de irradiação de alimentos em larga escala, adequado às reais condições e necessidades brasileiras (VITAL e LIMA, 2004 *apud* DE ALMEIDA, 2006).

Apesar da aprovação do emprego da irradiação, diversas barreiras persistem e impedem que alimentos irradiados alcancem a completa comercialização como barreiras relacionadas ao custo de sua utilização e aceitação pelo consumidor (ORNELLAS *et al.*, 2006; RESURRECCION *et al.*, 1995). As principais razões que justificam este fato são as preocupações e as dúvidas sobre o uso da radiação no processamento alimentar (BEHRENS *et*

*al.*,2009; CARDELLO, 2003; GUNES e TEKIN, 2006), além de interpretações errôneas e falta de informação do público consumidor (ORNELLAS *et al.*, 2006).

Atualmente, as autoridades sanitárias em mais de 40 países autorizam a irradiação (Figura 5) de mais de 60 tipos distintos de alimentos. Na figura 5, visualiza-se a distribuição global dos países que utilizam esta tecnologia.



**FIGURA 5: Utilização da irradiação de alimentos no mundo.** Legenda → Em verde são representados os países que a aplicam com fins comerciais.

**FONTE:** ICGFI (1999).

Dados apresentados por Kume *et al.*,(2009) mostram que a quantidade de alimentos irradiados mundialmente alcançou a dimensão de 405.000 toneladas no ano de 2005, contudo, a irradiação de méis não se mostra muito proeminente, e segundo tal estudo, os méis se incluem no pequeno segmento que alcançou de 17.000 toneladas (gráfico da figura 6), ou seja, menos que 4% da quantidade total de alimentos irradiados naquele ano.



**FIGURA 6: Gêneros alimentícios irradiados no mundo em 2005.**

**FONTE:** Kume *et al.*, (2009) - Adaptado.

Ainda dentro da temática mercadológica, o Brasil possui uma discreta participação na quantidade total de alimentos irradiados produzidos no mundo, com apenas 23.000 toneladas de alimentos irradiados, ou em termos percentuais 5,7% do total (KUME *et al.*, 2009).

### 3.9.4 - Princípios da irradiação:

A radiação ionizante, na forma de raios gama é obtida a partir de isótopos ou, comercialmente e em menor extensão, a partir de raios X e elétrons acelerados (FELLOWS, 2006). As radiações nucleares são emitidas principalmente nas formas de partículas alfa, partículas beta ou radiação gama. A radiação gama é gerada por um núcleo atômico, quando emite partículas alfa ou beta. Essa liberação é uma forma encontrada pelo núcleo para se "estabilizar", devido ainda restar energia em excesso no núcleo atômico com emissão de partículas nucleares (CENA, 2002b). A radiação gama, proveniente da fonte de cobalto-60, é um tipo de onda de alta frequência e curto comprimento (Figura 7), e por este motivo ela possui alto poder de penetração (CENA, 2002b).



**FIGURA 7: Espectro eletromagnético.**  
**FONTE: CENA (2002b).**

A quantificação das doses de radiação se faz em função da energia absorvida pelo produto e a unidade de medida usada é o Gray (Gy) ou quilogray (kGy) e um Gray equivale a um Joule de energia por quilograma de alimento irradiado (CENA, 2002b).

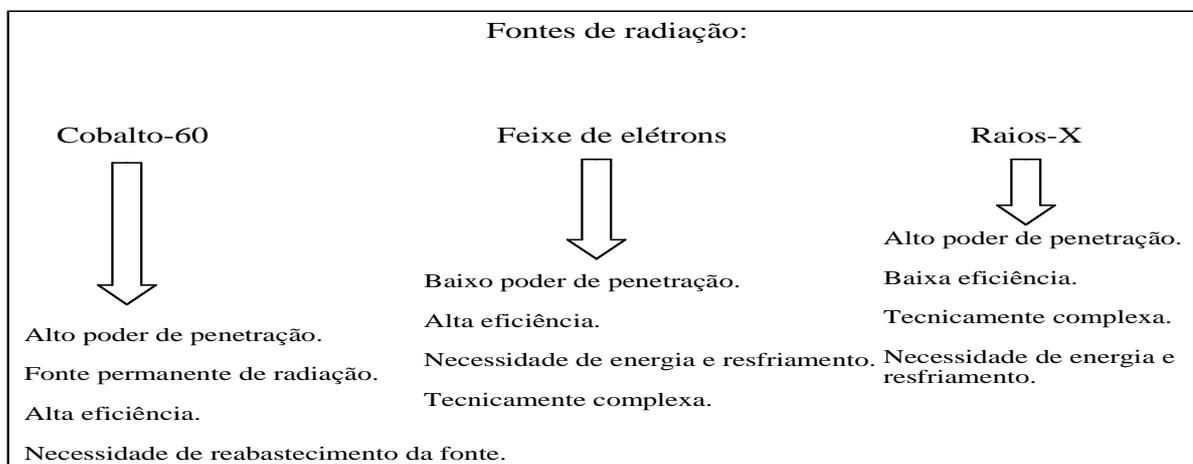
### 3.9.5 - Equipamentos utilizados:

Os equipamentos de irradiação consistem de uma fonte isotópica de alta energia para produzir raios gama ou, com menor frequência, de uma máquina emissora que produz feixes de elétrons de alta energia. A radiação gama a partir de cobalto-60 ( $\text{Co}^{60}$ ) ou césio-137 ( $\text{Cs}^{137}$ ) é utilizado na maioria das plantas de irradiação comerciais. O cobalto-60 emite raios gama com dois comprimentos de onda. O espectro gama exibe dois picos que têm energia de 1,17 e 1,33 MeV, respectivamente (KILCAST, 1995).

As fontes de radiação autorizadas pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) são: isótopos radioativos emissores de radiação gama (Cobalto 60 e Césio 137), raios X gerados por máquinas que trabalha com energias de até 5 MeV e elétrons acelerados por máquinas que trabalham com energia de até 10 MeV.

A irradiação de alimentos consiste na exposição controlada de uma amostra à radiação ionizante em fontes autorizadas, sendo principalmente usado como fonte de radiação gama o isótopo Cobalto-60, obtido pelo bombeamento com nêutrons do metal Cobalto-59 em um reator nuclear, com altos fluxos de nêutrons (da ordem de  $10^{14}$  a  $10^{15}$  n/cm<sup>2</sup>.s). Outros tipos de radiações também podem ser aplicados como os raios X e elétrons acelerados, contudo, o Cobalto-60 é o mais utilizado comercialmente em todo o mundo por sua disponibilidade, custo, apresentar-se na forma metálica e ser insolúvel em água, proporcionando, maior segurança ambiental (EHLERMANN, 1990). A figura 8 mostra a comparação entre as fontes de radiação.

Esses equipamentos consistem numa fonte de cobalto 60 instalada num "bunker", ou seja, uma câmara de irradiação cujas paredes são blindagens de concreto, na forma de labirintos. Essa fonte, quando a planta não está em operação, fica armazenada numa piscina (poço) com água tratada e desmineralizada. A piscina é revestida por um "liner" (revestimento) de aço inox, no interior da blindagem. Os alimentos a serem irradiados são colocados em "containers" e através de um monotrilha são conduzidos para o interior da câmara de irradiação, onde recebem a dose programada de radiação gama. Operadores qualificados controlam e monitoram eletronicamente a fonte de radiação e o tratamento dos produtos, através de um console situado numa sala fora da câmara de irradiação. (CENA, 2002a).



**FIGURA 8: Características das fontes de radiação.**

**FONTE:** Kilcast (1995) – Adaptado.

### 3.9.6 - Vantagens e limitações:

Segundo Fellows, (2006), as principais vantagens da irradiação em relação a outros métodos de conservação consistem na ausência ou minimização do aquecimento, reduzindo possíveis alterações sensoriais. Seu uso é amplo, podendo ser irradiados alimentos embalados ou congelados. Há possibilidade da eliminação de conservantes em alimentos e minimização do processamento porque o mesmo seria reduzido a uma etapa. O custo operacional e as alterações nutricionais observadas são comparáveis a outros métodos de conservação.

A principal limitação apresentada por Fellows (2006) é o alto custo de uma planta de irradiação. Contudo, havendo alta demanda, a planta se paga em pouco tempo. Segundo Hernandez, Vital e Sabaa-Srur, (2003) a irradiação apresenta limitações como todos os outros processos de conservação, dentre as quais os autores enumeram:

- Nem todos os alimentos se prestam à irradiação. Existem alimentos que, ao serem irradiados, sofrem mudanças na textura, na cor, ou no sabor, que acabam por torná-los indesejáveis para o consumidor.
- Geralmente, é necessária a utilização em conjunto com outros métodos de conservação (refrigeração, embalagens especiais, etc).
- Pode ocorrer re-infestação, caso não haja um controle adequado pós-irradiação. Uma vez que no processo de irradiação os efeitos deletérios são diretos, o alimento não adquire proteção contra novas contaminações, sendo fundamental o seguimento das boas práticas de manuseio.
- O processo, se não for bem conduzido, pode acarretar perdas de algumas vitaminas (A, B<sub>1</sub>, C e E).
- O processo de irradiação gera produtos radiolíticos semelhantes aos termolíticos produzidos pelo aquecimento ou por cocção de alimentos.

### 3.9.7 - A inativação de microrganismos pelo uso da radiação:

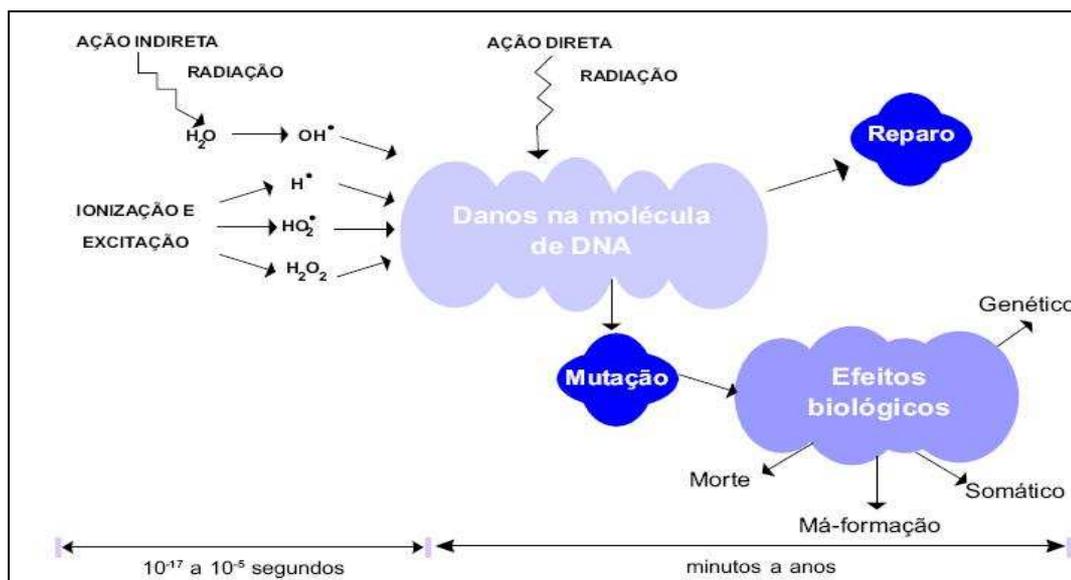
A habilidade da radiação para inativação de microrganismos é a principal razão para o uso da irradiação de alimentos. A radiação foi demonstrada como sendo um meio efetivo de destruição de bactérias patogênicas e não-patogênicas, bem como parasitas e em uma escala menor, vírus. Neste contexto, a radiação é vista como análoga a vários outros processos usados na eliminação de microrganismos como o aquecimento (MOY, 1993).

O mecanismo de ação envolvido na eliminação destes microrganismos pela irradiação consiste na capacidade altamente penetrante da radiação gama tendo esta o poder de quebrar

ligações químicas gerando íons, radicais livres e produtos radiolíticos (MOREHOUSE e KU, 1993). A irradiação fornece a energia necessária para que a homólise das ligações covalentes ocorra (SOLOMONS e FRYHLE, 2000).

A radiação, ionizante ou não-ionizante inativa os microrganismos pelo dano com mais frequência ao seu material genético. Este dano inviabiliza a multiplicação destas células e também compromete aleatoriamente a função da maioria das células microbianas (MOLINS, 2001). Danos ao material genético ocorrem como o resultado da colisão direta entre a energia radioativa e o material genético, ou como resultado da radiação ionizante em moléculas adjacentes as quais interagem com o material genético. Neste caso, um fóton da energia ou um elétron aleatoriamente arrancado se choca com o material genético do microrganismo e causa lesão no DNA. A lesão do DNA pode quebrar uma única fita do DNA, ou se a orientação do DNA é apropriada, a energia ou elétron pode quebrar ambas as fitas de DNA. Geralmente as primeiras lesões mencionadas são mais frequentes e se caracterizam por não serem letais aos microrganismos quando ocorrem em pequena escala, contudo quando há um amplo número de lesões os mecanismos de reparo não sobrepõem tais danos, resultando na morte celular. Quando há uma quebra nas ligações AT e CG que ligam duas fitas esta ligação pode ser regenerada. Já as lesões em ambas as fitas são invariavelmente letais, ocorrendo em menor número (YOKOYA *et al.*, 2008). A figura 9 mostra as consequências da radiação na molécula de DNA.

Numa primeira instância, os efeitos são simples. As interações da radiação com outras moléculas são mais complexas e na maioria das células, tais moléculas são de água (GRECZ, ROWLEY e MATSUYAMA, 1983). A radiação causa a perda de um elétron da molécula de água produzindo  $H_3O^+$  e um elétron. Estes produtos reagem com outras moléculas de água produzindo espécies radicalares, incluindo radicais hidrogênio e hidroxil, hidrogênio molecular, oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (DRAGANIC, 2005).



**FIGURA 9: Conseqüências da irradiação na molécula de DNA.**

**FONTE:** CNEN (2009).

As reações de radicais são de importância vital na biologia e na medicina, já que os mesmos são extremamente reativos, sendo capazes de causar danos, aleatoriamente, a todos os componentes do corpo (SOLOMONS e FRYHLE, 2000), e estes também estão presentes normalmente em alimentos não-irradiados devido à ação de lipoxigenases e peroxidases, durante processos de oxidação de gorduras e ácidos graxos e degradação de vitaminas lipossolúveis e pigmentos (FELLOWS, 2006). Os radicais livres gerados pelas reações radicalares possuem uma vida ínfima (menor que  $10^{-5}$ s), contudo suficiente para a destruição das células bacterianas, e quando colidem com outras moléculas, tendem a reagir de modo que seu elétron desemparelhado é levado a se emparelhar (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). As reações radicalares são constituídas por três etapas, a primeira etapa de iniciação da cadeia, na qual há a geração de duas espécies radicalares, que na etapa subsequente de propagação atacam outras moléculas geralmente mais complexas e a etapa de finalização da cadeia que acontece quando o elétron do radical livre se emparelha. Estes radicais reagem com os ácidos nucléicos e com as ligações químicas que os ligam sejam elas na mesma fita ou em fitas diferentes. Considerando que a ionização das moléculas de água é randômica, a reação radicalar com as fitas de DNA também se caracteriza por este comportamento (MOLINS, 2001).

As espécies reativas produzidas pela irradiação dos alimentos danificam ou destroem os microrganismos imediatamente, alterando a estrutura da membrana celular e afetando a atividade de enzimas metabólicas. Todavia, o efeito mais importante é no ácido

desoxirribonucleico (DNA) e nas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) necessários para o seu desenvolvimento e replicação (DERUITER e DWYER, 2002). Os efeitos da irradiação somente se tornam aparentes após um período de tempo, quando a dupla hélice do DNA não consegue desenrolar-se e o microrganismo não consegue reproduzir-se por meio de divisão celular (FELLOWS, 2006). Adicionalmente ao efeito no material genético, a radiação tem uma variedade de efeitos em outros componentes celulares. O uso da radiação em células resulta também em interações diretas e indiretas com os componentes celulares como membranas, enzimas e plasmídeos (YOKOYA *et al.*, 2008). Tais interações têm potencial para serem letais aos microrganismos.

A velocidade de destruição de microrganismos depende da velocidade com a qual os radicais são produzidos e interagem com o DNA, enquanto a redução do número de microrganismos depende da dose total de radiação recebida (THAYER, 1990). A sensibilidade do microrganismo à radiação é expressa pelo valor da dose de irradiação capaz de reduzir a população microbiana a 10% da quantidade inicial, denominada Dose D<sub>10</sub> (FARKAS, 2006). Da mesma forma que em outros métodos de conservação, a velocidade de destruição varia com a espécie de microrganismo, se o mesmo dispõe de aparato reparador de DNA, dentre outras características que fazem com que a velocidade de destruição não siga um padrão linear, e de uma maneira geral, os vírus são muito resistentes a irradiação e pouco provavelmente serão afetados por doses usualmente utilizadas comercialmente, as bactérias formadoras de esporos e aquelas capazes de reparar seu DNA são mais resistentes que as bactérias não esporulantes. Os insetos, parasitas e platelmintos requerem doses mais baixas de irradiação (FELLOWS, 2006).

### 3.9.8 - Efeitos básicos da radiação ionizante:

A principal vantagem da irradiação é que as mudanças produzidas por ela nos componentes alimentares, nas doses recomendadas para irradiação alimentar são pequenas. As mudanças não são produzidas por geração de calor, já que a irradiação causa um pequeno acréscimo de temperatura (KILCAST, 1995).

Na maioria dos alimentos a energia da irradiação é absorvida pela água presente de acordo com o efeito Compton (COULTATE, 2002), e quando a radiação passa pelos alimentos, ela perde energia. Em outras palavras, a energia é absorvida e esta absorção, leva a ionização ou excitação de átomos e moléculas no alimento, resultando em mudanças químicas que ocorrem quando o alimento é irradiado. Durante a irradiação gama (com o uso de <sup>137</sup>Cs,

ou,  $^{60}\text{Co}$ ), pode ocorrer o efeito fotoelétrico, ou, o espalhamento Compton. No primeiro caso, a energia de um fóton de radiação é totalmente absorvida por um elétron da camada K ou L e este é, geralmente, ejetado do átomo. No efeito Compton, a energia do fóton é parcialmente absorvida pelo elétron e este é deslocado para uma camada mais externa do átomo. Após, este retorna à sua órbita, emitindo raios X característicos. O fóton espalhado é desviado e continua, até alcançar outro elétron de outro átomo. Assim sendo, a interação entre os raios gama e os átomos faz com que estes se tornem íons positivos e as moléculas, em geral, são quebradas, provocando a geração de radicais livres. Estes radicais têm um elétron desemparelhado, são altamente reativos, e este elétron ioniza outros átomos e moléculas (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). Portanto há a excitação de moléculas e átomos que se tornam reativas podendo gerar reações radiculares em cadeia.

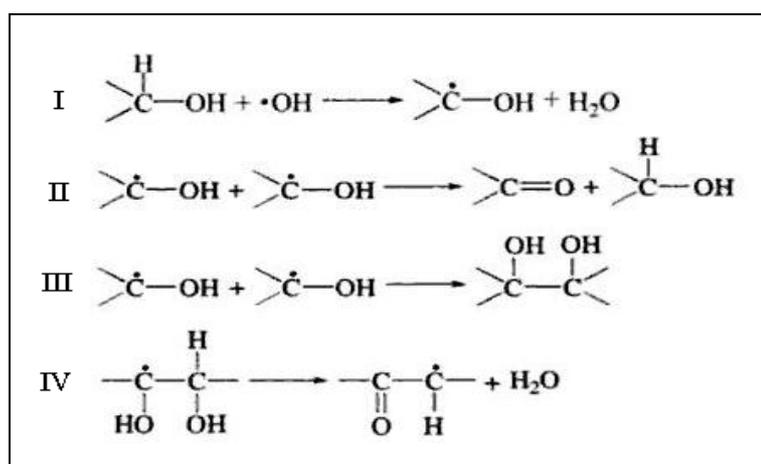
#### 3.9.8.1- Radiólise da água:

Em alimentos com alto teor de umidade, a água é ionizada pela irradiação. Os elétrons são expelidos das moléculas e quebram as ligações químicas. Tais produtos se recombinaem e geram hidrogênio, peróxido de hidrogênio e radicais hidrogênio, hidroxil e hidroperoxil (DRAGANIC, 2005). Os radicais hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) são poderosos agentes oxidantes, enquanto o elétron aquoso e o átomo de hidrogênio ( $\cdot\text{H}$ ) são agentes redutores. Por este fato, todos os alimentos contendo água podem sofrer oxidações ou reduções durante o processo de irradiação (STEVENSON, 1992 *apud* MOLINS, 2001). O radical hidroxil pode se adicionar a compostos olefínicos ou aromáticos e abstrair átomos de hidrogênio de ligações C-H enquanto o elétron aquoso pode rapidamente interagir com compostos aromáticos, ácidos carboxílicos, cetonas, aldeídos e tióis, já o átomo de hidrogênio abstrair hidrogênios da ligação C-H ou se adicionar a compostos olefínicos (NAWAR, 1986). O hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são produtos finais estáveis da radiólise da água. A figura 15 mostra o mecanismo da radiólise nas moléculas de água. Como o oxigênio é também oxidante, a irradiação de alguns alimentos em meios oxigenados pode resultar em autooxidação, gerando rancidez (TUKENMEZ *et al.*, 1997).

O rendimento dos produtos de radiólise da água aumenta linearmente com o aumento da dose irradiante. Portanto, quando são aplicadas altas doses há uma potencialização da geração de produtos secundários, oriundos do processo de irradiação (MOLINS, 2001).

### 3.9.8.2 - Efeitos da irradiação nos carboidratos:

A química da radiação voltada para carboidratos é complexa, já que numerosos produtos radiolíticos são possíveis (Figura 10). Os produtos radiolíticos da água, sobretudo o radical hidroxil, tem uma influencia significativa na natureza dos produtos radiolíticos formados na irradiação de açúcares em meios aquosos (OH *et al.*, 2005). Portanto, o radical hidroxil é primariamente importante na radiólise dos carboidratos.



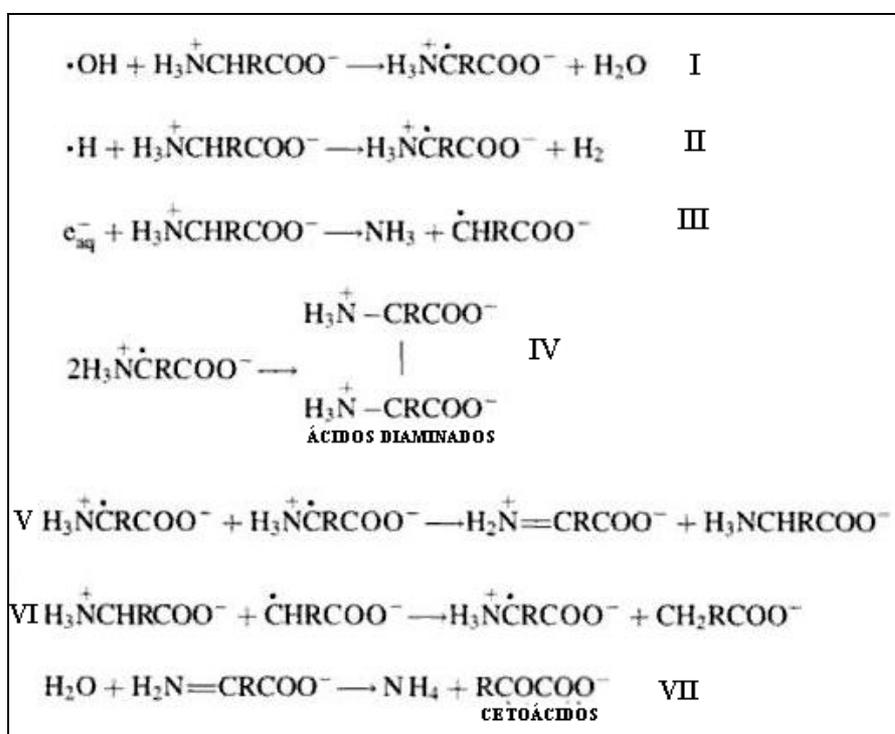
**FIGURA 10: Possíveis reações radiculares envolvendo carboidratos.** I – Abstração de próton , II – Disprotonação , III – Dimerização e IV – Desidratação.  
**FONTE:** Molins (2001).

A irradiação de açúcares de baixo peso molecular causa uma mudança em suas propriedades físicas e químicas. Quando açúcares são irradiados no estado sólido, o escurecimento pode ocorrer com alguns açúcares como glicose, frutose e xilose. A degradação destes açúcares pode resultar na formação de uma mistura de gases constituídos por H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, junto com traços de CH<sub>4</sub>, CO e H<sub>2</sub>O, e a relativa proporção depende do tipo de açúcar irradiado e da dose absorvida (OH *et al.*, 2005). O grau de degradação dos açúcares é proporcional a dose irradiada (KILCAST, 1995). Dauphin e Saint-Lebe, (1977) detectaram como produtos radiolíticos majoritários da irradiação da glicose em sistemas aquosos em condições de aerobiose o ácido glicônico, o ácido glicérico e ácido deoxicetohexônico. Em geral, os efeitos da irradiação nos carboidratos se assemelham ao aquecimento em condições alcalinas. O ataque pelos radicais livres causa fragmentação gerando compostos de baixo peso molecular como formaldeído e glicoxal. As ligações glicosídicas dos oligossacarídeos e polissacarídeos também são vulneráveis (COULTATE, 2002), e a irradiação é responsável pela quebra de cadeias glicídicas de alto peso molecular em unidades menores (KILCAST,

1995). A energia fornecida pela radiação ionizante é capaz de quebrar as ligações glicosídicas, formando monômeros de açúcares.

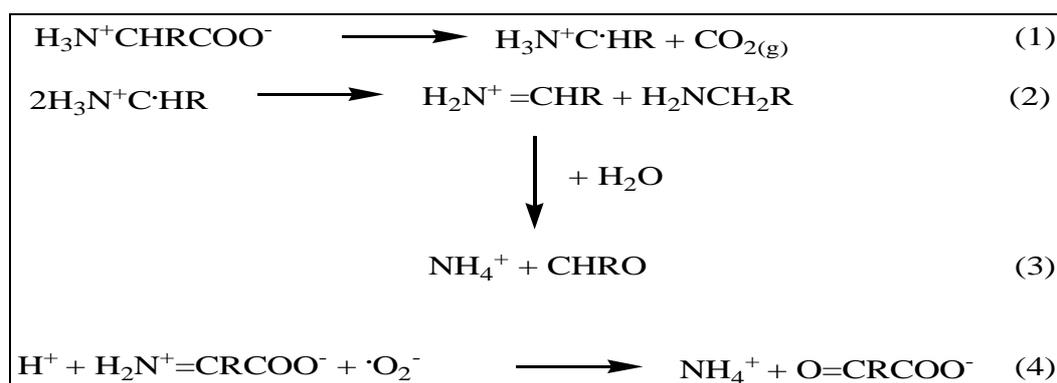
### 3.9.8.3 - Efeito da irradiação sobre as proteínas:

Existem 20 aminoácidos, cada qual com sua estrutura e composição únicas, por esta razão a aplicação da radiação ionizante é complexa, assim como a química das proteínas constituídas por eles (MOLINS, 2001). Na irradiação em meios aquosos, aminoácidos simples como a glicina e alanina sofrem a seqüência de reações, conforme mostrado na figura 11.



**FIGURA 11: Reações radiculares oriundas da irradiação envolvendo aminoácidos.** I e II – Abstração de prótons, III – Desaminação redutiva, IV – Formação de ácidos diaminados, V, VI e VII – Reações adicionais  
**FONTE:** Molins (2001).

A natureza exata dos produtos radiolíticos depende do aminoácido em questão. Se o oxigênio está presente em concentrações suficientemente altas, o átomo de hidrogênio será removido, e este bloqueia a desaminação redutiva. Também pode ocorrer a descarboxilação, levando a formação de uma amina que contém um carbono a menos que o aminoácido original que por sua vez pode gerar outras aminas e moléculas aldeídicas (Figura 12):



**FIGURA 12: Reações radiculares em compostos aminados promovidas pela irradiação.**  
 1 – Descarboxilação; 2 – Desaminação; 3 – Formação aldeídica; 4 – Formação de cetoácidos.  
 FONTE: Molins (2001) – adaptada.

No caso dos aminoácidos alifáticos, o aumento do comprimento da cadeia diminui a quantidade de desaminações oxidativas pela presença de ligações C-H adicionais disponíveis para interação com os radicais hidroxil (URBAIN, 1986).

Em geral, aminoácidos aromáticos e os contendo enxofre são mais sensíveis a irradiação (MOLINS, 2001). Os aminoácidos sulfurados agem como captadores e reagem mais prontamente com os radicais livres quando comparados aos aminoácidos alifáticos, e então provém efeito protetor contra a radiação ionizante (SIMIC, 1983). Os produtos finais estáveis da irradiação de alimentos contendo cisteína são sulfeto de hidrogênio e alanina. A produção de sulfeto de hidrogênio e metilmercaptana oriundos da metionina devem ser consideradas preocupantes, já que tais compostos levam ao aparecimento de sabores e odores indesejáveis (“off-flavors” e “off-odours”) (BREWER, 2009). Com respeito aos aminoácidos aromáticos e heterocíclicos, a hidroxilação dos anéis aromáticos é a principal reação (MOLINS, 2001).

A irradiação de peptídeos é similar a irradiação de aminoácidos (MOLINS, 2001). O aumento do número de ligações peptídicas amplia a reatividade frente aos elétrons hidratados. Os principais produtos radiolíticos resultantes da irradiação de peptídeos são amônia, ácidos graxos, ceto-ácidos e produtos “amida-like” bem como diaminoácidos resultantes da recombinação de radicais (DELINCÉE, 1983).

Visto que enzimas são proteínas, elas reagem com a radiação ionizante de maneira similar a descrita anteriormente, onde a sua inativação em sistemas aquosos é o amplo resultado dos produtos radiolíticos da água. Entretanto, a agregação enzimática induzida por radiação não se associa necessariamente com a perda da sua atividade (DELINCÉE e RADOLA, 1975).

As proteínas quando irradiadas com baixas doses sofrem alterações estruturais (LUCHT, BLANK e BORSA, 1998), já, com doses mais elevadas, ocorre rompimento da cadeia peptídica, polimerização, coagulação e precipitação. A irradiação prolongada faz com que haja a liberação de amônia, dióxido de carbono e compostos de enxofre, pois, grande parte dos aminoácidos livres são desaminados (MOLINS, 2001).

#### 3.9.8.4 - Efeitos da irradiação sobre as vitaminas:

Com a notável exceção da tiamina, retinol e tocoferol, a perda de vitaminas na irradiação é rápida. Muitas vitaminas são instáveis quando em solução, entretanto, contidas em alimentos complexos se estabilizam com outros componentes como açúcares e proteínas (COULTATE, 2002). Por este fato, constata-se que a irradiação de vitaminas em solução ou em modelos resulta numa redução considerável destes micronutrientes, mas em alimentos irradiados estes efeitos são raramente manifestados. Como em outros componentes principais de alimentos, as perdas vitamínicas são afetadas pela dose irradiante aplicada (OLSON, 1998), e adicionalmente deve-se considerar que também há a perda de vitaminas quando se aplica outros métodos de preservação como o aquecimento, portanto o efeito da radiação ionizante não deve ser atribuído somente ao processo de irradiação (STEVENSON, 1994).

A vitamina A ou retinol, no estado seco e os carotenóides pró-vitamina A principalmente o  $\beta$ -caroteno, são relativamente estáveis à radiação e, de acordo com Lukton e Mackinney, (1956) pouca inativação foi observada quando se aplicam doses de 20 kGy. Tal estabilidade da vitamina A frente à radiação se deve especialmente a formação de complexos estáveis destas vitaminas com proteínas contidas no alimento, criando assim um efeito protetor (TOBBACK, 1977). Além disso, deve-se considerar que os alimentos que são importante fonte desta vitamina não são comercialmente irradiados (STEVENSON, 1994).

A vitamina C ou ácido ascórbico exibe um alto grau de sensibilidade a radiação ionizante. Além disso, a vitamina C é prontamente oxidada a ácido dehidroascórbico durante a irradiação (SIMIC, 1983).

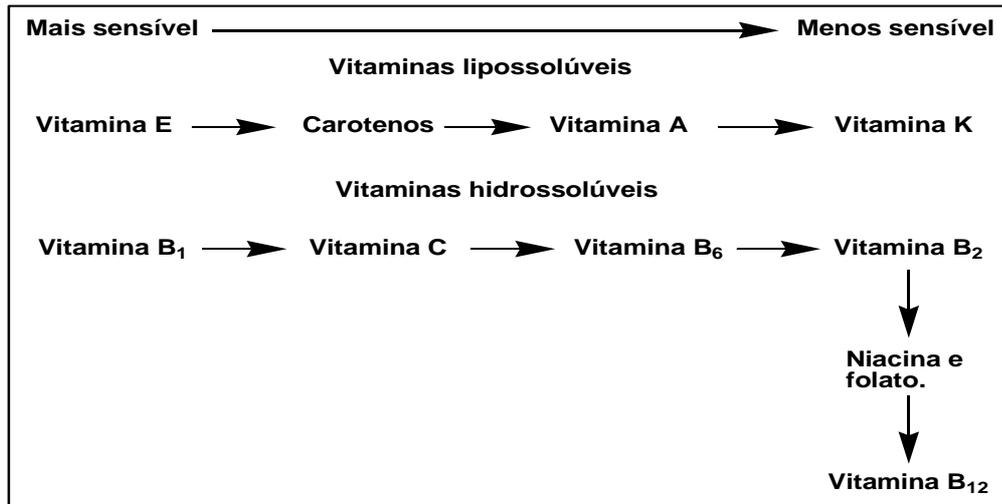
Quando são avaliados os níveis de vitamina C em alimentos irradiados, alguns estudos não consideram o fato da irradiação converter parcialmente o ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico, visto que ambos os compostos são biologicamente ativos. Novamente, os efeitos da irradiação nesta vitamina não são mais proeminentes que os efeitos produzidos por técnicas de processamento convencional (MOLINS, 2001).

A vitamina B<sub>1</sub> não é considerada somente a mais sensível das vitaminas hidrossolúveis a radiação, mas também apresenta caráter termolábil (FARKAS *et al.*, 2002). Por este fato, esta vitamina serve como um bom indicador para a perda de vitaminas hidrossolúveis em alimentos, e a justificativa para tal sensibilidade a radiação ionizante consiste na presença de ligações duplas entre heteroátomos, como as ligações C=N (MOLINS, 2001). A irradiação da tiamina em sistemas aquosos leva a formação da dihidrotiamina, que é uma forma biologicamente inativa, sugerindo que a radiólise da água e geração de radicais livres provenientes deste solvente tem papel crucial nesta inativação (MOLINS, 2001). De fato, segundo Coultate, (2002) a perda substancial de tiamina ocorre pelo ataque do radical hidroxil e do elétron hidratado a ligações C=S e C=O.

A destruição da tiamina em alimentos reflete a dose aplicada e as condições usadas durante a irradiação. Fox *et al.*, 1989 e Graham *et al.*, 1998 *apud* Molins, (2001) encontraram níveis diminuídos de tiamina com o acréscimo da dose irradiante.

A vitamina B<sub>6</sub> ou piridoxina é encontrada em diversos alimentos, e se apresenta em duas formas biologicamente ativas onde o grupamento álcool é substituído por aldeído (piridoxal) ou por grupo metilamina (piridoxamina) (MOLINS, 2001). De acordo com Kishore, Moorthy e Rao (1978, 1982) os produtos de degradação radiolítica da piroxidina se originam da oxidação pelos radicais hidroxil e por radicais produzidos da reação com peróxido de hidrogênio. Geralmente, a radiação ionizante, as doses comerciais não possuem um efeito significativo no conteúdo de piroxidina dos alimentos e as mudanças que ocorrem são similares ou menores que as induzidas por aquecimento (HAU e LIEW, 1993).

Assim como a vitamina B<sub>1</sub>, a vitamina B<sub>2</sub> ou riboflavina contém um número de ligações duplas com heteroátomos, e quando irradiada em ambientes aquosos ocorrem mudanças pela interação com produtos radiolíticos (URBAIN, 1986). Embora sensíveis a radiação ionizante quando em solução, o ácido fólico, a vitamina B<sub>5</sub> (niacina) e a vitamina B<sub>12</sub> (cianocobalamina) são estáveis à radiação gama quando presentes em alimentos, sendo a razão para estabilidade das mesmas a formação de complexos com outros componentes, impedindo a sua degradação e inativação (MOLINS, 2001). A figura 13 mostra a estabilidade das vitaminas frente à irradiação.



**FIGURA 13: Estabilidade das vitaminas frente à irradiação.**

FONTE: Molins (2001).

### 3.10 - Benefícios dos alimentos irradiados:

Buscar modos de prevenir a deterioração de alimentos e o controle de infecções ocasionadas por microrganismos é uma das principais preocupações da humanidade ao longo dos séculos. A irradiação de alimentos oferece uma ampla faixa de benefícios para a indústria alimentícia e para os consumidores. Do ponto de vista prático, existem três aplicações gerais e categorias de doses quando alimentos são tratados com radiação ionizante (ICGFI, 1999):

- Irradiação a baixas doses – doses menores que 1kGy – aplicadas na inibição do brotamento, atraso do amadurecimento, desinfestação de insetos e inativação de parasitas.
- Irradiação com doses medianas – doses de 1 a 10 kGy – aplicadas na redução do número de microrganismos deteriorantes, redução do número ou eliminação de patógenos não formadores de esporos.
- Irradiação a altas doses – doses acima de 10 kGy – aplicadas na eliminação do número de microrganismos visando esterilidade.

As aplicações da irradiação podem ser diversas e depende especificamente da matriz alimentícia, do tipo de microrganismo contaminante e do objetivo do tratamento. Existem essencialmente alguns tipos de aplicações que são descritas de forma sequencial.

### 3.10.1 - Redução dos microrganismos patogênicos:

A incidência crescente de enfermidades de origem alimentar resultante do consumo de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos é crescente. Do ponto de vista de saúde pública microrganismos como *E.coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* são preocupações primárias, devido a severidade das enfermidades por eles causadas e a alta incidência de surtos e casos individuais associados aos mesmos (SPOTO *et al.*, 2000). Neste âmbito, a redução de patógenos ou radiciação é definida como o tratamento do alimento com uma dose de energia ionizante suficiente para reduzir o número de bactérias patogênicas viáveis e não produtoras de esporos (CENA, 2002b).

Conseqüentemente, há uma aplicabilidade extremamente interessante, tendo em vista que seu uso é capaz de eliminar microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares (SPOTO *et al.*, 2000), através da aplicação de doses irradiantes medianas. CRAWFORD e RUFF, (1996) revisaram o uso de doses irradiantes de 10 kGy em frangos e crustáceos congelados para destruir *Campylobacter sp.*, *Escherichia coli* O157:H7 ou *Vibrio sp.*, sem causar as alterações sensoriais inaceitáveis que ocorrem na carne fresca.

A implantação das boas práticas de fabricação é obviamente essencial, mas isolada não é suficiente para a redução do número de surtos relacionados com infecções alimentares. Os patógenos citados anteriormente são sensíveis a baixos níveis de radiação ionizante. A radiciação aplica doses geralmente situadas entre 2 a 8 kGy (SATIN, 1997) . A gama de alimentos passíveis de radiciação é ampla, constituída de alimentos como sucos, carnes e massas frescas, bem como laticínios, carcaças de frango, patas de rã, ovos e frutos do mar (FARKAS, 2006).

### 3.10.2 - Descontaminação e esterilização:

A radapertização ou esterilização é o tratamento do alimento com uma dose de energia ionizante suficiente para prevenir a decomposição e a toxidez de origem microbiana, sejam quais forem o tempo e as condições de armazenamento do produto, desde que este não seja contaminado novamente, e segundo Fellows, (2006) esta aplicação gera a destruição completa dos microrganismos presentes em um dado alimento.

Condimentos, ervas e temperos (especiarias) são valorizados por seu sabor, coloração e aromas distintos (DIEHL, 2002). Contudo, eles são freqüentemente contaminados de forma massiva, sobretudo por fungos filamentosos e bactérias esporulantes resistentes ao calor

(BANERJEE e SARKAR, 2003; BUCKENHUSKES e RENDLEN, 2004), e esta contaminação se dá devido às condições e o ambiente de processamento. A umidade é a maior responsável pela proliferação de fungos filamentosos em condimentos. Por conseguinte, antes que sejam incorporados a outros produtos, a carga microbiana deve ser reduzida. Os tratamentos térmicos ocasionam uma perda significativa no sabor, então métodos como a irradiação se tornam alternativas ideais (POLOVKA e SUHAJ, 2010), inclusive frente a gases esterilizantes como o óxido de etileno que foi proibido pela União Européia em 1991 (MISHRA, GAUTAM e SHARMA, 2004). A radapertização não gera perda significativa de óleos voláteis, sem modificações em sua principal característica de qualidade (FELLOWS, 2006). As doses requeridas na radapertização geralmente estão entre 10 e 50 kGy, sendo as doses irradiantes aplicadas para condimentos até 30 kGy (BREWER, 2009). A radapertização é muito empregada para produtos cárneos (FARKAS, 1998), sobretudo quando a irradiação é feita com alimentos congelados. Entretanto, há um grande paradigma quando se recorre a radapertização. Essa prática é excelente para carnes, não produzindo nenhum efeito sensorial, principalmente quando congeladas. Mas, para muitos outros alimentos, como geralmente, as doses utilizadas com este propósito são extremamente elevadas, e podem ocasionar mudanças notáveis e desagradáveis no perfil sensorial de muitos alimentos. Um exemplo deste prejuízo está na alteração significativa do aspecto morfológico de frutas quando submetidas a altas doses irradiantes (FRANÇOSO *et al.*, 2008).

A radapertização tem outras aplicações interessantes do ponto de vista nutricional. Com a aplicação de doses irradiantes maiores que 25 kGy, alimentos que são pré-aquecidos para inativação enzimática são comercialmente esterilizados como ocorre no enlatamento. Os produtos esterilizados podem ser armazenados a temperatura ambiente por longos períodos. Os alimentos esterilizados pela radiação são dados aos pacientes hospitalares que possuem deficiências no sistema imunológico e devem, portanto ter uma dieta estéril (PRYKE e TAYLOR, 2008). Os produtos esterilizados por irradiação também são consumidos por astronautas por sua qualidade superior, segurança e variedade, em preferência a alimentos tratados por outras técnicas de preservação (PERCHONOK e BOURLAND, 2002).

### 3.10.3 - Radurização:

A radurização é encarada como tratamento semelhante à pasteurização, causa a redução na contagem de microrganismos deterioradores viáveis. Tal aplicação é utilizada para prevenir brotamentos em bulbos e tubérculos (BENKEBLIA, ONODERA e SHIOMI, 2004; CROCI, BANEK e CURZIO, 1995), retardar o tempo de maturação de frutas (CAMARGO, TADINI e SABATO, 2007; SINGH e PAL, 2009), prevenir a deterioração por fungos filamentosos em frutas, hortaliças, bulbos, tubérculos (PRAKASH *et al.*, 2000a, 2000b) e controle de infestação por insetos e ácaros (DE TOLEDO *et al.*, 2007; SALIMOV *et al.*, 2000), e as doses utilizadas para este fim são baixas. O tempo de prateleira de frutas e vegetais, carnes, frangos, peixes e frutos do mar são consideravelmente prolongados pelo tratamento com combinações de irradiação a baixas doses e refrigeração não produzindo alterações no *flavor* e textura (CORBO *et al.*, 2009). Muitos microrganismos deteriorantes como *Pseudomonas* spp. são relativamente sensíveis a radiações (FERNÁNDEZ e PIZARRO, 1996). A extensão do curtíssimo tempo de prateleira de muitos vegetais comercialmente importantes é altamente desejável.

A aplicação da irradiação para o aumento do tempo de vida de prateleira se baseia em baixas doses com intuito de eliminar bactérias não-esporulantes, fungos filamentosos e leveduras. Esse processo reduz geralmente as células microbianas vegetativas (FELLOWS, 2006).

A exposição a baixas doses irradiantes reduz a maturação de algumas frutas e vegetais (OLSON, 1998), além de controlar o apodrecimento causado por fungos filamentosos, estendendo o seu tempo de prateleira (BASKARAN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006). Esta extensão pode ser de 2 a 3 vezes quando as frutas são armazenadas a 10°C (FELLOWS, 2006). O amadurecimento de bananas (STRYDOM e WHITEHEAD, 1990; THOMAS, DHARKAR e SREENIVASAN, 2006) (Figura 14), mangas (MOY e WONG, 2002; SABATO *et al.*, 2009) e mamões (CAMARGO, TADINI e SABATO, 2007; D'INNOCENZO e LAJOLO, 2007) é retardado com doses de 0,25 a 1 kGy, morangos e kiwis são freqüentemente tratados com radiação contra infestação por fungos filamentosos do gênero *Botrytis* (KIM e YOOK, 2009; PAN *et al.*, 2004). Porém, estes produtos devem ser irradiados antes do processo de amadurecimento se iniciar, pois há a sua inibição, de forma que a irradiação suspende a produção de hormônios e enzimas que interrompem os processos bioquímicos de divisão e crescimento celular (D'INNOCENZO e LAJOLO, 2007).



**FIGURA 14: Efeitos da irradiação no amadurecimento de bananas.**  
**FONTE: CENA (2002b).**

De uma forma geral, a extensão do tempo de prateleira depende da qualidade inicial do alimento fresco, que deve ser tão boa quanto possível (ICGFI, 1999). Uma combinação de irradiação, embalagens com atmosfera modificada e refrigeração propiciam um efeito sinérgico que prolonga ainda mais o tempo de prateleira dos alimentos irradiados (LACROIX *et al.*, 1995).

Entretanto, a irradiação não é conveniente a todos os frutos e vegetais por causa de mudanças indesejáveis na cor e/ou na textura o que limita a sua aceitação. Variedades diferentes de frutas e vegetais respondem distintamente, notam-se também respostas diferenciadas em relação ao tempo de colheita e estado fisiológico das frutas e dos vegetais (ICGFI, 1999).

A irradiação de cogumelos com baixas doses irradiantes inibe a abertura do chapéu, o alongamento do tronco, e a extensão do tempo de prateleira pode ser aumentada quando o produto é acondicionado em atmosferas modificadas (JIANG *et al.*, 2010).

Com objetivo de prover aos consumidores suprimentos ao longo de todo ano de alimentos como batatas, cebolas, inhame, batata doce e outros vegetais, o armazenamento ao longo de muitos meses é necessário ao menos que transferências para outras zonas climáticas freqüentemente com preços mais altos substituam a produção local nos períodos de entressafra. Tal armazenamento seria possível através do uso da refrigeração, entretanto a mesma envolve altos custos, particularmente nas regiões tropicais e subtropicais. Para se prolongar o armazenamento de tais vegetais se aplicava inibidores químicos de brotamento como a hidrazida maléica, profame e cloroprofame, mas tais inibidores deixam resíduos nos alimentos, criando assim um risco toxicológico (ICGFI, 1999). Dentro da problemática apresentada, a inibição do brotamento de batatas (figura 15), cebolas e alhos pela irradiação passou a ser empregada. O uso de doses muito baixas inibe o brotamento de uma diversidade de produtos como batatas, inhames, cebolas, alhos, gengibre e castanhas (ICGFI, 1999).



**FIGURA 15: Efeitos da radiação ionizante no brotamento de batatas.**

I – batatas não irradiadas e II – batatas irradiadas.

FONTE: ICGFI (1999).

Outro grande problema em termos de estocagem é a preservação de grãos e produtos a base de grãos da infestação por insetos que causam danos extensivos aos estoques destes produtos. A desinfestação de alimentos por irradiação se constitui um processo extremamente útil quando se considera grãos e frutas tropicais que são infestadas por larvas e insetos (DE TOLEDO *et al.*, 2007; MOY e WONG, 2002; SABATO *et al.*, 2009). A irradiação demonstra ser um método efetivo no controle de pestes para estes “commodities” e é uma boa alternativa frente a agentes químicos como brometo de metila, que eram amplamente utilizados com o propósito de desinfestação (BRIGIDE, 2002). A irradiação é uma excelente metodologia, uma vez que a sua aplicação é válida também quando os insetos apresentam resistência a agentes químicos tradicionalmente destinados a este propósito. A desinfestação é capaz de prevenir perdas causadas por insetos quando estes atuam sobre grãos, farinha, cereais, grãos de café, frutas secas, nozes e outros produtos secos (ICGFI, 1999).

### 3.11 - Irradiação de méis:

Através dos tópicos já citados anteriormente, verifica-se que a irradiação é uma franca possibilidade de metodologia aplicável na conservação de méis, sobretudo frente ao emprego do aquecimento que como referenciado em tópicos anteriores tem notável influencia nos principais parâmetros de qualidade do dito alimento. Apesar de tal constatação, existe um número limitado de estudos que possuem como temática central a irradiação de méis. Tais estudos se concentram na avaliação de alguns parâmetros físico-químicos e microbiológicos em doses variantes.

Jo *et al.*, (2005) avaliaram quatro tipos distintos de méis nas condições controle, irradiados a 5 e 10 kGy e verificaram as contagens totais de bactérias aeróbias, coliformes, fungos filamentosos, leveduras e bactérias do gênero *Clostridium*. Tais autores obtiveram reduções significativas da contagem do total de bactérias aeróbias e de bactérias do gênero

*Clostridium* quando as amostras eram irradiadas a 5 kGy, e concluíram que a irradiação é uma importante ferramenta na eliminação de microrganismos.

Migdal *et al*, (2000) avaliaram o impacto da irradiação, com 10 kGy, em sete amostras na contagem total de bactérias aeróbias, fungos filamentosos, leveduras e esporos de *Clostridium* quando confrontado com os valores iniciais, e notaram reduções significativas das contagens total de bactérias aeróbias, de fungos filamentosos e leveduras e redução variável dos esporos de *Clostridium*. Tais autores relatam que a diminuição da contagem de leveduras é importante, tendo em vista que há a limitação dos fenômenos fermentativos que alteram a qualidade e estabilidade do produto.

Outros estudos avaliam as alterações provocadas pela irradiação em parâmetros físico-químicos de méis. Matsuda e Sabato (2004) estudaram a viscosidade de amostras de méis, bem como o impacto da irradiação na sua aceitação quando duas amostras irradiadas (5 e 10 kGy) eram confrontadas com a condição controle. Os autores afirmam que apesar da irradiação ser utilizada com frequência na redução de bactérias e fungos filamentosos, pouca informação se encontrava disponível sobre seus efeitos na viscosidade, que é uma importante propriedade do mel. Através de tal investigação não se encontrou variações estatisticamente significativas produzidas pela radiação na viscosidade das amostras, embora tenha sido comprovado um decréscimo significativo na aceitação do mel orgânico irradiado a 10 kGy, em virtude de uma alteração no sabor das amostras. Além disso, também se constatou mudança significativa na cor do mel do Paraná irradiado a mesma dose.

Em outro estudo, Sabato (2004) investigou a reologia de mel irradiado na região do Paraná, não tendo sido constatadas variações significativas na viscosidade das amostras não irradiadas em comparação com as amostras irradiadas.

Souza *et al*, (2008) visaram a caracterização físico-química e sensorial de mel de abelha de floradas silvestres irradiados a 5, 10, 15 e 25 kGy. Tais autores afirmam que são constatadas variações irrelevantes das amostras irradiadas com os valores observados para a amostra controle. Em termos sensoriais, não houve mudanças significativas no sabor nem no odor, somente clareamento das amostras constatado nas doses mais elevadas.

Estudos mais recentes buscam avaliar de forma mais completa as possíveis implicações da irradiação na qualidade do produto. Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) estudaram o efeito da radiação gama no controle de qualidade físico-químico de sete amostras de méis não irradiadas e irradiadas a 10 kGy. Nesses trabalhos, constataram similaridade para alguns parâmetros físico-químicos e mudanças significativas, do ponto de vista estatístico, em algumas amostras para parâmetros como o conteúdo de 5-hidroximetilfurfural (HMF),

açúcares redutores livres e totais, sacarose aparente e acidez livre ou total, e concluíram que, apesar do tratamento por irradiação, todas as amostras estão de acordo com a legislação vigente em nosso país. Em estudo mais complexo acerca da irradiação de méis, Saxena, Gautam e Sharma, (2009) publicaram estudos que concluíram que doses de 15 kGy são efetivas na completa eliminação de microrganismos sem que os parâmetros físicos, bioquímicos, organolépticos e antibacterianos sejam alterados significativamente.

### 3.12 - Análise sensorial:

#### 3.12.1 – Aspectos gerais:

A análise sensorial é definida como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações para que características de alimentos ou materiais sejam percebidas pelos cinco sentidos humanos denominados visão, olfato, paladar, tato e audição (STONE e SIDEL, 2004). A avaliação dos alimentos desde o ponto de vista sensorial é uma disciplina integrada que permite estabelecer a qualidade através dos atributos do produto (GROSSO, 2006). As características sensoriais estimulam os sentidos e provocam vários graus de reações de desejo ou rejeição, em que o consumidor escolhe um alimento pelo seu nível de qualidade sensorial (SODRÉ *et al.*, 2008), e segundo Piana *et al.*, 2004, esta análise é usada em diversos campos e permite o estabelecimento de perfis organolépticos de diversos produtos e tem como objetivo a determinação da percepção de consumidores.

O realce da importância relativa à análise sensorial data de tempo recente. Durante a década de 40 e meados da década de 50 a análise sensorial ganhou ímpeto adicional do Instituto de Alimentos e Armazenamento do Exército dos Estados Unidos (PERYAN *et al.*, 1954 *apud* STONE e SIDEL, 2004), evidenciando o reconhecimento da importância da aceitação alimentar. Os problemas envolvendo aceitação de alimentos foram relativamente esquecidos ao longo das décadas de 60 e 70, onde os governos desenvolveram programa que continham o seu foco simplesmente no combate a fome (STONE e SIDEL, 2004). Portanto, até a década de 60, as técnicas de análise sensorial não se desenvolveram apreciavelmente e contavam basicamente com a experiência profissional de peritos, sendo descritas como técnicas simples e de baixo custo operacional (PIANA *et al.*, 2004). A indústria alimentícia, possivelmente notando o sucesso do governo em políticas erradicantes da fome e a negligência, em relação aos aspectos sensoriais propriamente ditos, iniciou o provimento de suporte para este ramo emergente da ciência (STONE e SIDEL, 2004). Embora muitas indústrias reconhecessem o valor de tal ciência, o reconhecimento pleno da avaliação

sensorial como uma distinta função no interior do meio industrial permaneceu mínimo (STONE e SIDEL, 2004). Na segunda metade do século XIX, métodos de avaliação sensorial novos e melhorados foram desenvolvidos usando protocolos experimentais controlados e bem definidos, além de técnicas estatísticas para o processamento dos resultados. A vantagem destes métodos frente aos tradicionais é que os resultados são reprodutíveis, embora a complexidade e altos custos limitem o seu uso no campo da pesquisa e desenvolvimento de novos produtos (PIANA *et al.*, 2004).

No caso específico do mel, a análise sensorial foi primariamente usada na França com técnicas tradicionais pelo grupo de pesquisa coordenado por Gonnet (PIANA *et al.*, 2004). Na Itália, as idéias de Gonnet se difundiram e se dedicaram muitos esforços em atividades de treinamento, e uma organização denominada Registro de Peritos Italianos em Análises Sensoriais de Mel foi fundada e criou-se uma metodologia tradicional de padrões que incluía terminologias harmonizadas, formas de avaliação, métodos de prova, métodos de treinamento e seleção de assessores, e ainda descrições sensoriais dos principais méis monoflorais europeus (PERSANO ODDO e PIRO, 2004). O legado de Gonnet também repercutiu em outros países europeus. Em 1998, a “International Honey Commission” (IHC) fundou um grupo de trabalho para estudar especificamente as análises sensoriais deste alimento.

### 3.12.2 - O uso da análise sensorial em méis:

O mel é um alimento produzido pelas abelhas melíferas, originando-se de néctares de mais de 2500 espécies florais ou, de secreções de partes vivas das plantas, possuindo características extremamente variáveis (LENGLER, 2004 *apud* ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005). Em termos sensoriais, ele é um alimento apreciado por seu sabor característico (SODRÉ *et al.*, 2008). Este sabor e aroma característicos são determinados por substâncias presentes em diminutas concentrações (BASTOS *et al.*, 2002), e que são termolábeis (TOSI *et al.*, 2008). A qualidade do mel produzido pelas abelhas depende de vários fatores tais como: tipo de planta, condições geográficas, climáticas, espécie melífera e manejo (APARNA e RAJALAKSHMI, 1999). Na sua extração e manejo deve-se ter muito cuidado para que ele não sofra contaminação por parte de resíduos, fuligens de fumaça ou armazenamento em recipientes e locais inapropriados, pois tudo isso influenciará nas suas características sensoriais (ARNAUD *et al.*, 2008). Sua produção, propriedades físicas, composição química, utilidade e aplicações têm sido discutidas comumente, levando-se em consideração que as características sensoriais são muito importantes para a sua aceitação

(APARNA e RAJALAKSHMI, 1999). Segundo ANUPAMA *et al.*, (2003), as propriedades sensoriais são os principais parâmetros na determinação da sua qualidade, sendo a análise sensorial um instrumento que mede e quantifica as características do produto pelos sentidos humanos (GROSSO, 2006; ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005). O uso do controle de qualidade sensorial considera atributos como cor, aroma, consistência e sabor. Estes atributos estão sempre interligados e dependem de substâncias voláteis que se relacionam à fragrância original das flores onde o néctar foi coletado. O aroma e sabor estão relacionados diretamente com a cor do mel e dependem majoritariamente de sua origem floral (CAC, 1990; ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005).

Portanto, a avaliação sensorial nos permite distinguir a origem botânica dos méis, além de identificar e quantificar certas discrepâncias ocasionadas por fermentações, impurezas e presença de “off-flavors” e “off-odours” (PIANA *et al.*, 2004), embora algumas destas discrepâncias sejam notadas em outras análises laboratoriais.

A cor do mel está correlacionada com a sua origem floral, o processamento e armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual ele amadurece na colméia. Logo, as suas características sensoriais são dadas de acordo com vários fatores (ARNAUD *et al.*, 2008). Méis com coloração mais escura apresentam um sabor mais proeminente (ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005), ou seja, há a possibilidade evidente de se criar uma inter-relação entre a sua coloração e o seu sabor (APARNA e RAJALAKSHMI, 1999). Através da avaliação da natureza colorimétrica é possível efetuar a complementação de propriedades e fatores de qualidade tais como o conteúdo de minerais, conteúdo de polifenóis, atividade diastásica, aminoácidos livres e conteúdo de hidroximetilfurfural (GROSSO, 2006). Contudo, quando o aroma e o sabor estão mascarados, não se torna possível a identificação da origem do mel, classificando-se como mel silvestre (LEGLER, 2004 *apud* ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005). O envelhecimento, armazenamento e temperatura são fatores que alteram todos os atributos sensoriais (ALVES, DELLA MODESTA e SOUZA e SILVA, 2005). Métodos analíticos e instrumentais efetivos em detectar o surgimento de problemas durante o processo de conservação de alimentos são conhecidos na literatura, embora muitas vezes se tornem incapazes de medir alterações perceptíveis que afetam a aceitação do produto (CARDELLO e CARDELLO, 1998). Entretanto, por diversas vezes a mistura de substâncias presentes em um único alimento dificultam sua identificação plena pelos provadores (COULTATE, 2002), este fato é ratificado por Castro-Vazquez *et al.*, (2006a, 2006b e 2009) que identificaram mais de 120 compostos voláteis que contribuem para o aroma único dos méis.

As razões pelas quais a análise sensorial é realizada são a aquisição de dados complementares aos obtidos pelas análises instrumentais, sobretudo pelas análises físico-químicas e melissopalínológica, classificação dos méis monoflorais e reconhecimento de misturas entre méis, manutenção das propriedades sensoriais relacionadas aos méis no seu estado “*in natura*”, através da otimização das condições de coleta e processamento e agregação do valor de mercado por meio da avaliação da qualidade de procedência conhecida, visto que já existe um aumento da demanda para produtos agro-alimentares detentores de características químicas e organolépticas particulares relacionadas à denominação de origem geográfica (ESTI *et al*, 1997). Neste contexto, a grande diversidade de vegetações existentes no Brasil concede aos apicultores a possibilidade de obter diferentes tipos de méis monoflorais provenientes das mais diversas floradas, cada um com sua particularidade organoléptica diretamente ligada à flora explorada pelas abelhas melíferas (BENDINI e SOUZA, 2008). A determinação do ensaio sensorial mais adequado constitui a etapa crítica na maioria dos estudos científicos publicados atualmente, e esta escolha metodológica deve ser basear invariavelmente no objetivo do estudo. Em termos de escolha das características a serem avaliadas durante a análise sensorial são preconizadas as que evidenciam aspectos olfato-gustativos, já que os aspectos visuais e táteis são influenciados pelo processamento e armazenamento do produto (PIANA *et al.*, 2004).

Uma grande problemática associada aos estudos sensoriais envolvendo méis está fundamentada na formulação dos descritores de cada uma das floradas, de modo que alguns descritores pertinentes a uma florada não se aplicam a outras, devido à complexidade de aspectos determinantes do aroma e sabor e da multiplicidade de fatores que afetam todos os atributos. Frequentemente, usam-se descritores na análise descritiva quantitativa de mel disponível em estudos antecessores referente a este alimento (ANUPANA *et al*, 2003; CIAPPINI, 2002; ESTUPINÁN *et al*, 1999; MANZANARES, 2002). Tais autores consideram os principais atributos a aparência que engloba parâmetros como cor, conformação e uniformidade, o odor que envolve centenas de compostos voláteis, o gosto que engloba os sabores doce, amargo, salgado e ácido, entre outros e a textura que agrega parâmetros como granulidade e viscosidade (GROSSO, 2006). Contudo, segundo Grosso (2006) é complexo o uso de provas sensoriais para o estabelecimento de atributos que contribuam para a qualidade de méis, tendo em vista o caráter oneroso deste processo que implica em gastos de tempo. Tal processo também está altamente sujeito a erros devido à própria variabilidade humana. De acordo com este mesmo autor existem métodos

calorimétricos, texturométricos e químicos que proporcionam boas correlações unidimensionais dos atributos sensoriais.

### 3.12.3 - Alterações sensoriais promovidas pela irradiação:

Os alimentos com altos teores de gorduras, em especial gorduras poliinsaturadas não se prestam para a irradiação (HONG *et al.*, 2010; MIYAHARA *et al.*, 2002), tendo em vista a geração radicalar mencionada e a possibilidade de fenômenos de oxidação de gorduras e óleos que culminam com o desenvolvimento de rancidez destas matrizes alimentícias (SOLOMONS e FRYHLE, 2000). A extensão dos efeitos nos alimentos de tais aplicações dependerá essencialmente da natureza do alimento, bem como o alvo de aplicação, dentro desta gama de possíveis processos envolvendo a tecnologia de irradiação. Os alimentos não desenvolvem qualquer tipo de radioatividade, o que os torna seguros do ponto de vista toxicológico. Os produtos radiolíticos reagem com componentes presentes nos alimentos, contudo como foi mencionada anteriormente, a extensão da radiólise depende do alimento e da dose irradiada em questão.

## 4 - MATERIAIS E MÉTODOS:

### 4.1 – Aquisição e irradiação das amostras:

Adquiriram-se oito quilos de méis florais de cada uma das três floradas [monoflorais de laranjeira (família Rutaceae e gênero *Citrus*) e eucalipto (família Myrtaceae e gênero *Eucalyptus*) e polifloral silvestre (origem botânica múltipla)] de um único fornecedor idôneo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) advindos de três apiários localizados nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, respectivamente. A data de acondicionamento dos méis identificada nas embalagens eram janeiro de 2009, novembro de 2008 e outubro de 2008, respectivamente, sendo destinados especificamente potes de 1Kg dos méis monoflorais e 2Kg do mel polifloral (figura 16-I).

A transferência e o envase dos méis foram executados assepticamente em capela previamente higienizada com álcool 70%. As amostras foram irradiadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN) localizado na COPPE/UFRJ em irradiador GAMMA CELL 220 EXCEL, MDS Nordion (Figura 16–IV) em frascos estéreis de polietileno de 300 g com uma massa aproximada de 250 g (Figura 16-III). Destinou-se 1,250 Kg de cada florada para as análises físico-químicas, 1,250 Kg para as análises microbiológicas e 5,500 Kg para as análises sensoriais, sendo designados e identificados 10 frascos contendo 250 g para as análises físico-químicas e microbiológicas e 22 frascos contendo 250 g para a análise sensorial por florada e considerando cada dose irradiante aplicada.

As amostras de mel foram irradiadas num irradiador contendo fonte de Cobalto-60. As doses irradiantes selecionadas foram 5,10,15 e 25 kGy. Sabe-se que a atividade de uma espécie radioativa decai, esponencialmente, com o tempo, de acordo com sua constante de decaimento ( $\lambda$ ), a qual é característica de cada nuclídeo. A atividade de uma fonte radioativa num dado momento é dada por:

$$A = A_0 \cdot e^{-\lambda t} \quad (1)$$

onde, A, é a atividade atual e  $A_0$  a atividade no momento da calibração da fonte, ou no instante após a sua formação (ou produção num reator nuclear); t é o tempo transcorrido desde a calibração da fonte até o momento atual.

#### **EQUAÇÃO 1: Fórmula para o cálculo da taxa de dose.**

A constante de decaimento,  $\lambda$ , é dada por:

$$\lambda = \ln 2/t_{1/2} \quad (2)$$

onde  $t_{1/2}$  é a meia-vida da espécie radioativa.

**EQUAÇÃO 2: Fórmula para o cálculo da constante de decaimento.**

A meia-vida do Cobalto-60 é 5,27 anos. Assim, para se calcular a Dose utilizada é necessário se conhecer a Taxa de Dose (TD) da fonte utilizada. O cálculo da TD pode ser feito usando-se a mesma fórmula para o cálculo da atividade de uma fonte radioativa, de acordo com a equação (1), ou seja:

$$TD = TD_0 \cdot e^{-(\ln 2/t_{1/2}) \cdot t} \quad (3)$$

onde, TD é a Taxa de Dose atual da Fonte de Cobalto-60 do irradiador,  $TD_0$  é a Taxa de Dose anterior, obtida por dosimetria,  $t_{1/2}$  é a meia-vida do Cobalto-60 e t, o tempo transcorrido desde o cálculo de  $TD_0$ , por dosimetria, até o momento da irradiação.

**EQUAÇÃO 3: Fórmula para o cálculo da taxa de dose atual da fonte de Cobalto-60.**

Assim, obtida a Taxa de Dose (TD), em Gy/min., para o momento do início da irradiação, calcula-se o tempo de irradiação para que se atinja a dose de radiação gama.

Os méis foram, então, posicionados no interior de um tubo de PVC contendo pequenos discos de acrílico que potencializam a irradiação até atingirem a altura da tampa do frasco e esse tubo de PVC era colocado dentro do receptáculo do irradiador (Figura 16-II).



**FIGURA 16: I - Amostras em potes de 1Kg e 2Kg ; II – Acondicionamento das amostras no interior do tubo de PVC e preenchimento com discos de acrílico ; III – Amostras armazenadas em frascos de 250g ; IV – Irradiador do Laboratório de Instrumentação Nuclear.**

Após a irradiação as análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Controle Bromatológico (LABCBROM) localizado no Departamento de Produtos Naturais e Alimentos (CCS-UFRJ), enquanto as análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos (LACMAC) localizado no Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (CCS-UFRJ).

## 4.2 – Avaliação dos parâmetros físico-químicos:

### 4.2.1 – Umidade e sólidos solúveis totais:

Os parâmetros físico-químicos foram compostos de ensaios realizados em triplicata e baseados nas metodologias oficiais, sendo a umidade e os sólidos totais determinados por método refratométrico, metodologia AOAC n° 969.38 (AOAC, 1998). Foi utilizado o refratômetro modelo Carl Zeiss N°: 326011 para tais determinações.

### 4.2.2 – pH e acidez livre:

Executou-se a determinação do pH através de método potenciométrico com potenciômetro Digimed modelo DMPH-2 previamente limpo e calibrado com as soluções tampão pH 4 e 7, sendo efetuada previamente ao ensaio para determinação de acidez livre. A acidez livre foi determinada pelo uso da metodologia que se baseia na titulação com solução de hidróxido de sódio 0,05 M previamente fatorada até pH 8,5, metodologia AOAC n° 962.18 (AOAC, 1998). Posteriormente procedeu-se o cálculo da acidez livre mostrado na equação 4.

$$\text{Acidez Livre (meq/kg)} = \frac{(V - V_b) \times 50 \times f}{P} \quad (4)$$

Onde, V é o volume em mL da solução de NaOH gasto na titulação, V<sub>b</sub> é o volume em mL desta solução gasto no ensaio branco, f é o fator da solução de NaOH e P é o massa da amostra em gramas.

**EQUAÇÃO 4: Fórmula para o cálculo da acidez livre.**

#### 4.2.3 – Resíduo Mineral Fixo (cinzas):

A determinação do resíduo mineral fixo (cinzas) foi efetuado pesando-se 5g de amostra nos cadinhos de porcelana, submeteu-se a aquecimento brando e gradativo para a carbonização parcial do material até que o mesmo não liberasse gás (Figura 17). Posteriormente, as amostras foram colocadas na mufla com temperatura de 450°C, de acordo com a metodologia CAC 7.5 (CAC, 1990). O cálculo da porcentagem de cinzas é executado de acordo com a equação 5.



**FIGURA 17: Progressão da reação de carbonização executada em fonte convencional de aquecimento.**

$$\% \text{ cinzas} = \frac{(P_{\text{cad}} + P_{\text{cinzas}} - P_{\text{cad}}) \times 100}{P_{\text{amostra}}} \quad (5)$$

Onde  $P_{\text{cad}}$  é a massa do cadinho em gramas,  $P_{\text{cinzas}}$  é a massa de cinzas obtidas por incineração e  $P_{\text{amostra}}$  é a massa de amostra pesada no início do ensaio.

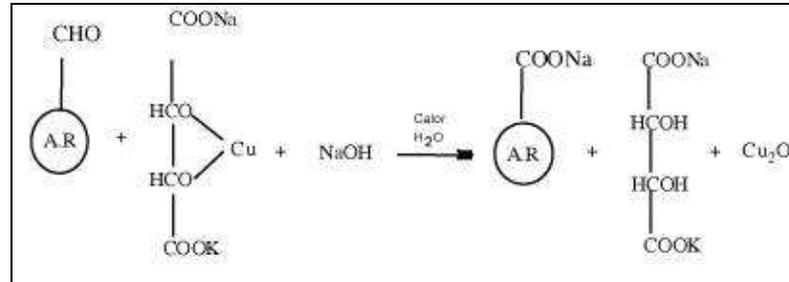
**EQUAÇÃO 5: Fórmula para determinação da porcentagem de resíduo mineral fixo (cinzas).**

#### 4.2.4 – Açúcares redutores livres:

A determinação de açúcares redutores livres e açúcares redutores totais se baseiam na metodologia CAC 7.1, detectando glicose + frutose (Figura 30) (CAC, 1990).

A reação com reagente de Fehling se baseia no poder de redução que os açúcares livres têm sobre o cobre presente no “pool” das soluções de Fehling titulados (Figura 18). A titulação é procedida com aquecimento de modo que o erlenmeyer sempre apresente uma solução em ebulição, e deste modo, cria-se o meio propício para que os açúcares redutores

livres reduzam o cobre inicialmente no estado de oxidação +2 (coloração azulada) para o estado de oxidação +1 (coloração avermelhada) quando o pH do meio é básico, ditado pela presença de hidróxido de sódio na preparação das soluções de Fehling (Figura 19). Posteriormente efetuou-se o cálculo de açúcares redutores livres em glicose (Equação 6).



**FIGURA 18: Reação base de redução do cobre pelo método Lane-Eynon.**  
**FONTE:** Silva *et al.*, (2003a).



**FIGURA 19: Progressão da reação para determinação de açúcares redutores livres (método de Lane & Eynon).**

$$X = \frac{V_{\text{tit}} \times P_{\text{amostra}}}{200 \text{ mL}} \longrightarrow Y = \frac{f \times 100}{X} \quad (6)$$

Onde, X é a massa de amostra em gramas contida no volume gasto na titulação, V<sub>tit</sub> é o volume em mL gasto na titulação da solução de Fehling, Y é o teor de açúcares redutores na amostra expresso em g/100g e f é o fator da solução de Fehling.

**EQUAÇÃO 6: Fórmula para o cálculo de açúcares redutores livres.**

#### 4.2.5 – Açúcares redutores totais:

A determinação de açúcares redutores totais segue metodologia CAC 7.1 (CAC, 1990). O cálculo para açúcares redutores totais é demonstrado pela equação 7:

$$X = \frac{P_{amostra} \times 20}{200} \longrightarrow Y = \frac{f \times 100}{V_{tit}} \longrightarrow Z = \frac{Y \times 100}{X} \quad (7)$$

Onde, X é a massa de amostra contida em 20 mL de solução, Pamostra é a massa de amostra original usada para ensaio de açúcares redutores livres, Y é massa de amostra contida em 100 mL de solução amostra, f é o fator da solução de Fehling, Vtit é o volume em mL gasto para a titulação da solução de Fehling e Z é o teor de açúcares redutores totais expresso em g/100g.

**EQUAÇÃO 7: Fórmula para o cálculo de açúcares redutores totais.**

#### 4.2.6 – Sacarose aparente:

A sacarose aparente foi determinada pela metodologia CAC 7.2 (CAC, 1990) através da seguinte relação (Equação 8):

$$\text{Sacarose Aparente (g/100g)} = (\text{ART} - \text{ARL}) \times 0,95 \quad (8)$$

Onde ART é o teor de açúcares redutores totais em g/100g e ARL é o teor de açúcares redutores livres em g/100g.

**EQUAÇÃO 8: Fórmula para o cálculo da sacarose aparente.**

#### 4.2.7 – Atividade diastásica:

A determinação da atividade diastásica segue o método CAC 7.7 (CAC, 1990). Determinou-se a absorbância a 660 nm em intervalos periódicos de 5 minutos, até obtenção de valor de absorbância menor que 0,235. Construiu-se posteriormente a curva-padrão da absorbância versus o tempo em minutos no software Excel sendo determinado o tempo exato onde a absorbância atingia 0,235. Todas as retas obtidas apresentaram valores de R<sup>2</sup> superiores a 0,9900 e a atividade diastásica foi calculada segundo a seguinte relação matemática (Equação 9). O resultado foi expresso em unidades Gothe por grama de mel.

$$\text{Atividade diastásica (Unidades Gothe)} = \frac{300}{tx} \quad (9)$$

Onde tx é o tempo exato em que a absorvância atinge o valor 0,235.

**EQUAÇÃO 9: Fórmula para o cálculo da atividade diastásica.**

#### 4.2.8 – Conteúdo de 5-hidroxiacetilfurfural:

A quantificação do conteúdo de 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) segue a metodologia AOAC nº 980.23 (AOAC, 1998) e baseia-se na leitura da absorvância a 284 e 336 nm da solução obtida após adição dos reagentes de Carrez e filtração. As leituras executadas foram feitas no espectrofotômetro Shimadzu modelo UV Mini 1240 e o posterior cálculo do conteúdo de 5-hidroxiacetilfurfural feito de acordo com a equação 10:

$$\text{HMF (mg/Kg)} = \frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5}{P} \quad (10)$$

Onde  $A_{284}$  é a leitura da absorvância a 284nm,  $A_{336}$  é a leitura da absorvância a 336 nm e P é a massa da amostra em gramas.

**EQUAÇÃO 10: Fórmula para o cálculo do conteúdo de hidroxiacetilfurfural.**

### 4.3 - Análises microbiológicas:

As análises microbiológicas de amostras das três floradas de méis (laranjeira, eucalipto e silvestre), irradiadas (5 e 10 kGy) e do controle foram selecionadas com bases nos resultados das análises físico-químicas, avaliadas em duplicatas e os resultados expressos em UFC/g de mel. Em caso de constatação de colônias típicas de microrganismos específicos, as relativas provas bioquímicas seriam executadas.

#### 4.3.1 - Contagem de Bactérias Aeróbias Mesófilas:

A contagem foi executada em meio de cultura Ágar Padrão para Contagem em Placa (PCA) seguindo metodologia do Bacteriological Analytical Manual (BAM, 1998).

#### 4.3.2 - Contagem de *Bacillus cereus*:

A contagem de *Bacillus cereus* foi feita em meio Ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MPY) (BAM, 1998).

#### 4.3.3 - Contagem de *Staphylococcus aureus*:

A contagem de *Staphylococcus aureus* foi feita através do uso do meio de cultura Ágar Baird-Parker (BP) (BAM, 1998).

#### 4.3.4 - Contagem de *Salmonella sp*:

A metodologia para detecção e contagem de Salmonelas nos meios Ágar *Salmonella-Shigella* (SS), Ágar Entérico de Hektoen (HE), Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Xilose Lisina Tergitol 4 (XLT4) como meios seletivos específicos para a detecção (APHA, 2001; BAM, 1998).

#### 4.3.5 - Contagem de *Pseudomonas aeruginosa*:

A contagem de *Pseudomonas aeruginosa* foi feita através de meio seletivo Ágar Cetrimide (BAM, 1998).

#### 4.3.6 - Contagem de fungos filamentosos e leveduras:

As diferentes diluições decimais foram inoculadas em placas contendo meio Ágar Batata Dextrose (PDA) tratado com antibiótico clortetraciclina (BAM, 1998).

### 4.4 - Análise sensorial:

#### 4.4.1 - Teste de diferença em relação ao controle ou teste triangular (Norma NBR 12995):

O objetivo deste teste é constatar se as amostras irradiadas diferiam estatisticamente em relação à condição controle. O teste de diferença em relação ao controle seguiu a norma NBR 12995 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) (ABNT, 1993).

Irradiaram-se as amostras de méis de distintas floradas no dia anterior ao dia do referido teste para evitar que possíveis alterações decorrentes de longos períodos de armazenamento pudessem influenciar de alguma forma no teste de diferença.

O teste de diferença entre as amostras realizado em escala laboratorial 24 horas após a irradiação para as três floradas na condição controle e irradiadas a 5 e 10 kGy.

Os provadores selecionados (não treinados, que gostavam de mel e não fumantes) para o teste sensorial foram 20 estudantes universitários (graduação) de ambos os sexos e com média de idade de 22 anos, somando um total de 60 provadores nos 3 testes. Os provadores não recebiam qualquer informação acerca do tratamento previamente empregado nas amostras, pois este fato poderia condicioná-los a um padrão de resposta.

As amostras foram pesadas (10 gramas) em copos plásticos descartáveis brancos incolores de 20 mL codificados com 3 dígitos aleatórios e contendo colheres plásticas. Este preparo foi feito no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Escola de Química da UFRJ.

Cada provador recebia a ficha de teste (Apêndice A), três amostras codificadas e uma amostra padrão (letra P), e deveria assinalar na ficha, segundo o seu julgamento, o grau de similaridade destas com a condição P numa escala de 7 pontos que partia da pontuação 0 (a amostra é idêntica ao controle) até a pontuação 6 (a amostra é muito diferente da condição controle). Além disso, o indivíduo também recebia um copo com água e biscoitos de água e sal, os quais o indivíduo recebia instruções prévias a entrada no recinto de teste de consumi-los para limpar a boca e realizar a prova da amostra seguinte.

O teste sensorial foi realizado em ampla, climatizada, organizada e silenciosa sala que dispunha de quatro cadeiras e quatro mesas em separado localizadas em extremos da sala para que os provadores não tivessem contato entre si.

Para a análise estatística dos dados realizou-se a análise de variância e teste de Dunnett (a 5% de significância) com o auxílio do software estatístico GRAPHPAD PRISM.

#### 4.4.2 - Teste de preferência:

Com base nos resultados das análises sensoriais de diferença (teste triangular), foram realizados os testes de preferência, nas amostras de méis eucalipto e silvestre não irradiados e os respectivos irradiados a 10 KGy. As amostras foram preparadas (pesadas e codificadas) no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (EQ-UFRJ).

Provadores não treinados (100 indivíduos), não fumantes, jovens aparentemente saudáveis e consumidores de mel, foram recrutados na Escola de Química (UFRJ) e, imediatamente antes da avaliação sensorial, cada provador foi instruído quanto a forma de proceder ao teste.

Em sala climatizada (~ 22 °C) foi apresentado a cada provador de uma única vez, uma amostra (codificada) de mel na condição controle (ou eucalipto ou silvestre), uma amostra (codificada) de mel irradiada a 10 kGy (florada respectiva), um copo com água e biscoito de água e sal (utilizados na limpeza da boca entre as provas).

Os provadores assinalaram o número do código referente à amostra de sua preferência, indicaram o motivo da preferência e os dados coletados foram analisados (Apêndice B).

#### 4.4.3 – Perfil de consumo:

Para avaliação do perfil do consumidor, os mesmos 100 indivíduos que participaram do teste de preferência preencheram um questionário (Apêndice B) sobre frequência, local, horário, condição e motivações de consumo de méis.

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO:

### 5.1 - Constatações gerais das análises físico-químicas:

Antes de se iniciar a apresentação dos resultados, é importante mencionar alguns aspectos observados durante o transcorrer das análises, a fim de levantar novas evidências e defrontá-las com alguns aspectos já presentes na literatura e em outros estudos.

Durante a finalização da irradiação dos méis foram notados os seguintes aspectos:

- ⇒ A irradiação dos méis gera um ligeiro aquecimento na amostra.
- ⇒ A irradiação dos méis modifica a sua coloração, principalmente nos primeiros dias após o tratamento.
- ⇒ A irradiação dos méis gera uma espuma característica, com consistência espessa e ocorrem também mudanças na viscosidade do produto (Figura 20).
- ⇒ A quantidade de espuma formada por méis de distintas floradas é diferenciada, sugerindo um comportamento único para cada uma das floradas.



**FIGURA 20:** Comparação entre condição controle e amostra irradiada com 15KGy em termos de formação de espuma.

## 5.2 – Resultados das análises físico-químicas:

**TABELA 2: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis poliflorais silvestres em função das doses irradiantes aplicadas.**

Parâmetro/Dose	0KGy	5KGy	10KGy	15KGy	25KGy	Legislação <sup>1</sup>
Umidade (%)	17,4* <sup>a</sup>	17,4* <sup>a</sup>	17,3* <sup>a</sup>	17,2* <sup>a</sup>	17,2* <sup>a</sup>	Inferior a 20%
Sólidos Totais	81* <sup>a</sup>	**				
pH	4,23* <sup>a</sup> (0,14)	4,26* <sup>a</sup> (0,27)	4,25* <sup>a</sup> (0,27)	4,21* <sup>a</sup> (0,24)	4,19* <sup>b</sup> (0,24)	**
Acidez Livre (meq/Kg)	38,18±0,23 <sup>a</sup> (0,60)	38,29±0,23 <sup>a</sup> (0,61)	36,87±0,07 <sup>b</sup> (0,19)	36,65±0,05 <sup>b</sup> (0,15)	36,19±0,03 <sup>c</sup> (0,08)	Inferior a 50 meq/Kg
Açúcares Redutores Livres (g/100g)	74,44±0,11 <sup>a</sup> (0,15)	74,59±0,26 <sup>a</sup> (0,35)	75,52±0,37 <sup>b</sup> (0,48)	76,75±0,36 <sup>c</sup> (0,47)	80,69±0,16 <sup>d</sup> (0,20)	Superior a 65g/100g
Açúcares Redutores Totais (g/100g)	76,72±0,14 <sup>a</sup> (0,18)	76,47±0,12 <sup>a</sup> (0,16)	77,95±0,43 <sup>b</sup> (0,56)	79,23±0,36 <sup>c</sup> (0,45)	81,28±0,20 <sup>d</sup> (0,24)	**
Sacarose Aparente (g/100g)	2,09±0,13 <sup>a</sup> (6,11)	1,78±0,15 <sup>a</sup> (8,32)	2,31±0,12 <sup>ab</sup> (5,17)	2,42±0,13 <sup>b</sup> (5,40)	0,56±0,05 <sup>c</sup> (8,76)	Inferior a 6g/100g
Resíduo Mineral Fixo (%)	0,28* <sup>a</sup>	0,31* <sup>a</sup>	0,30* <sup>a</sup>	0,31* <sup>a</sup>	0,30* <sup>a</sup>	Inferior a 0,6%
Atividade Diastásica (unid.Gothe)	25,77±0,24 <sup>a</sup> (0,91)	26,89±0,33 <sup>a</sup> (1,25)	26,28±0,29 <sup>a</sup> (1,09)	25,22±0,62 <sup>a</sup> (2,47)	24,98±0,75 <sup>a</sup> (3,01)	Superior a 8 esc.Gothe
Hidroximetilfurfural (mg/Kg)	18,02±0,03 <sup>a</sup> (0,19)	22,54±0,10 <sup>b</sup> (0,45)	27,00±0,09 <sup>c</sup> (0,35)	31,55±0,05 <sup>d</sup> (0,16)	36,1±0,12 <sup>e</sup> (0,34)	Inferior a 60mg/Kg

Resultados expressos em: Média±SD (CV%).\*Desvio padrão e coeficiente de variação iguais ou menores que 0,01;\*\*Dados não disponíveis.

<sup>1</sup>Valores de referência da Instrução Normativa nº11/2000 do MAPA. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

**TABELA 3: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis monoflorais de eucalipto em função das doses irradiantes aplicadas.**

Parâmetro/Dose	0KGy	5KGy	10KGy	15KGy	25KGy	Legislação <sup>1</sup>
Umidade (%)	17,8* <sup>a</sup>	17,6* <sup>a</sup>	17,6* <sup>a</sup>	17,4* <sup>b</sup>	17,4* <sup>b</sup>	Inferior a 20%
Sólidos Totais	80,5* <sup>a</sup>	80,5* <sup>a</sup>	80,5* <sup>a</sup>	80,5* <sup>a</sup>	80,5* <sup>a</sup>	**
pH	4,32* <sup>a</sup> (0,23)	4,32* <sup>a</sup> (0,23)	4,33* <sup>a</sup> (0,13)	4,30* <sup>a</sup> (0,27)	4,28* <sup>b</sup> (0,23)	**
Acidez Livre (meq/Kg)	40,95* <sup>a</sup> (0,02)	40,15±0,35 <sup>b</sup> (0,88)	40,19±0,08 <sup>b</sup> (0,21)	37,99±0,01 <sup>c</sup> (0,25)	44,18±0,20 <sup>d</sup> (0,47)	Inferior a 50 meq/Kg
Açúcares Redutores Livres (g/100g)	75,52±0,23 <sup>a</sup> (0,31)	76,45±0,42 <sup>b</sup> (0,54)	75,68±0,37 <sup>ab</sup> (0,49)	75,22±0,25 <sup>a</sup> (0,32)	79,55±0,33 <sup>c</sup> (0,41)	Superior a 65g/100g
Açúcares Redutores Totais (g/100g)	78,46±0,38 <sup>a</sup> (0,48)	79,54±0,53 <sup>a</sup> (0,66)	78,48±0,52 <sup>a</sup> (0,66)	77,39±0,20 <sup>a</sup> (0,26)	81,67±0,30 <sup>b</sup> (0,37)	**
Sacarose Aparente (g/100g)	2,78±0,19 <sup>a</sup> (6,93)	2,93±0,20 <sup>a</sup> (6,72)	2,66±0,15 <sup>a</sup> (5,55)	2,06±0,07 <sup>b</sup> (3,44)	1,44±0,15 <sup>c</sup> (10,8)	Inferior a 6g/100g
Resíduo Mineral Fixo (%)	0,33* <sup>a</sup> (1,73)	0,33* <sup>a</sup> (1,73)	0,34* <sup>a</sup> (1,68)	0,33* <sup>a</sup> (1,73)	0,34* <sup>a</sup> (1,71)	Inferior a 0,6%
Atividade Diastásica (unid.Gothe)	22,74±0,20 <sup>a</sup> (0,88)	22,33±0,23 <sup>a</sup> (1,04)	22,89±0,17 <sup>a</sup> (0,75)	21,72±0,47 <sup>b</sup> (2,15)	21,68±0,16 <sup>b</sup> (0,76)	Superior a 8 esc.Gothe
Hidroximetilfurfural (mg/Kg)	16,03±0,80 <sup>a</sup> (5,06)	20,83±0,25 <sup>b</sup> (1,19)	22,96±0,31 <sup>c</sup> (1,34)	24,92±0,33 <sup>d</sup> (1,34)	28,17±0,17 <sup>e</sup> (0,62)	Inferior a 60mg/Kg

Resultados expressos em: Média±SD (CV%).\*Desvio padrão e coeficiente de variação iguais ou menores que 0,01;\*\*Dados não disponíveis.<sup>1</sup>Valores de referência da Instrução Normativa nº11/2000 do MAPA. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

**TABELA 4: Médias obtidas e resultados da análise estatística através do Teste de Tuckey a 5% de significância para cada parâmetro físico-químico de méis monoflorais de laranjeira em função das doses irradiantes aplicadas.**

Parâmetro/Dose	0KGy	5KGy	10KGy	15KGy	25KGy	Legislação <sup>1</sup>
<b>Umidade (%)</b>	16,8* <sup>a</sup>	16,6* <sup>a</sup>	16,6* <sup>a</sup>	16,4* <sup>b</sup>	16,4* <sup>b</sup>	Inferior a 20% **
<b>Sólidos Totais</b>	81,5* <sup>a</sup>	81,5* <sup>a</sup>	81,5* <sup>a</sup>	81,5* <sup>a</sup>	81,5* <sup>a</sup>	**
<b>pH</b>	4,19* <sup>a</sup> (0,24)	4,17* <sup>a</sup> (0,24)	4,11* <sup>b</sup> (0,37)	4,04* <sup>c</sup> (0,25)	4,05* <sup>c</sup> (0,28)	**
<b>Acidez Livre (meq/Kg)</b>	11,24±0,03 <sup>a</sup> (0,28)	11,15* <sup>b</sup> (0,05)	10,67* <sup>c</sup> (0,05)	10,23±0,04 <sup>d</sup> (0,43)	11,80* <sup>e</sup> (0,10)	Inferior a 50 meq/Kg
<b>Açúcares Redutores Livres (g/100g)</b>	75,63±0,01 <sup>a</sup> (0,13)	76,37±0,18 <sup>b</sup> (0,23)	76,28±0,21 <sup>b</sup> (0,27)	78,59±0,25 <sup>c</sup> (0,32)	81,15±0,22 <sup>d</sup> (0,28)	Superior a 65g/100g **
<b>Açúcares Redutores Totais (g/100g)</b>	78,35±0,12 <sup>a</sup> (0,15)	78,88±0,10 <sup>b</sup> (0,13)	78,54±0,10 <sup>ab</sup> (0,13)	80,77±0,11 <sup>c</sup> (0,14)	82,36±0,18 <sup>d</sup> (0,22)	**
<b>Sacarose Aparente (g/100g)</b>	2,58±0,03 <sup>a</sup> (1,02)	2,38±0,08 <sup>a</sup> (3,44)	2,15±0,12 <sup>ab</sup> (5,83)	2,07±0,13 <sup>b</sup> (6,28)	1,14±0,07 <sup>c</sup> (6,62)	Inferior a 6g/100g
<b>Resíduo Mineral Fixo (%)</b>	0,04* <sup>a</sup>	0,05* <sup>a</sup>	0,04* <sup>a</sup>	0,03* <sup>a</sup>	0,05* <sup>a</sup>	Inferior a 0,6%
<b>Atividade Diastásica (unid.Gothe)</b>	14,31±0,16 <sup>a</sup> (1,15)	14,50±0,10 <sup>a</sup> (0,69)	14,10±0,09 <sup>a</sup> (0,63)	14,70±0,12 <sup>a</sup> (0,82)	14,54±0,18 <sup>a</sup> (1,27)	Superior a 8 esc.Gothe
<b>Hidroximetilfurfural (mg/Kg)</b>	1,31±0,09 <sup>a</sup> (6,61)	1,46±0,09 <sup>a</sup> (6,12)	1,66±0,15 <sup>a</sup> (9,32)	2,27±0,20 <sup>b</sup> (9,00)	3,32±0,03 <sup>c</sup> (0,90)	Inferior a 60mg/Kg

Resultados expressos em: Média±SD (CV%).\*Desvio padrão e coeficiente de variação iguais ou menores que 0,01;\*\*Dados não disponíveis.<sup>1</sup>Valores de referência da Instrução Normativa nº11/2000 do MAPA. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatisticamente significativa (p<0,05).

### 5.2.1 - Comparação com a legislação e análise estatística:

Através da observação dos resultados demonstrados nas tabelas 2, 3 e 4 referente às análises físico-químicas dos méis de floradas silvestres, eucalipto e laranjeira, respectivamente, verifica-se que, apesar das variações notadas experimentalmente, os valores obtidos para cada parâmetro físico-químico, que é regulamentado pela Instrução Normativa nº 11/2000 do MAPA, apresentam-se dentro dos limites preconizados pela mesma, o que evidencia a qualidade dos méis perante a legislação.

A análise de parâmetros básicos da estatística como o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV%) consiste num prognóstico sobre a qualidade em termos estatísticos dos dados obtidos experimentalmente. Executou-se o cálculo dos mesmos com o programa Excel.

Outra inferência estatística importante é a realização de testes que visam à avaliação dos dados verificando se há diferença significativa. No caso deste estudo, os resultados foram submetidos ao teste-T com significância de 5%. A opção pelo teste-T se justifica pelo mesmo ter sido robusto o suficiente para detectar diferenças entre os valores. Por isso, buscou-se a realização do teste-T com objetivo de detectar diferenças do ponto de vista estatístico em

relação à condição controle, em resumo avaliar se há grandes modificações durante a irradiação.

Analisando de forma genérica os dados observados nas tabelas 2, 3 e 4, nota-se que o número de alterações significativas aumenta com o aumento da dose irradiante, para todas as floradas em questão, o que reflete que tratamentos com doses mais elevadas têm influencia marcante nos parâmetros físico-químicos de qualidade dos méis. No geral, quando aplicadas doses de até 10 kGy, as amostras ainda mantêm ao menos 50% dos seus 10 parâmetros físico-químicos inalterados.

A seguir, são avaliados os resultados de cada parâmetro físico-químico e discutidas as alterações observadas. Após essas avaliações e discussões, essas serão associadas a possíveis constatações experimentais.

#### 5.2.1.1 - Umidade:

A resposta da umidade frente à irradiação é bem similar nas amostras das três floradas estudadas. O perfil de resposta da umidade das amostras quando estas são submetidas à irradiação revela que há uma tendência a redução do conteúdo de água com o aumento da dose irradiante (Figura 21; tabelas 2,3 e 4).

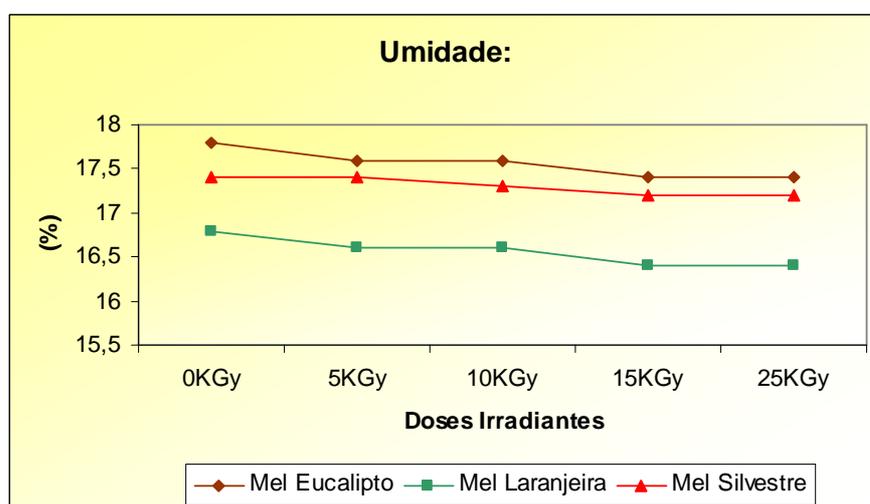
Tal comportamento se justifica pela proporcionalidade da radiólise das moléculas de água com a duração e a dose da irradiação, fato constatado por Molins, (2001). Portanto, em doses mais altas é plausível a observação de menores teores de umidade quando comparadas a amostras não irradiadas.

As amostras de méis monoflorais de eucalipto e laranjeira sofreram queda significativa (2,2 e 2,4%, respectivamente) da umidade, quando submetidas a doses de 15 e 25 kGy. Tal redução pode ser vista como interessante uma vez que há a possibilidade de se reduzir o valor de atividade de água, já que estudos mencionados anteriormente mostram que se pode associar a umidade com a atividade de água. Já para o mel polifloral silvestre, não houve alteração significativa dos teores de umidade mesmo com altas doses. Mas, também foi observada redução da umidade em 1,1% o que demonstra a radiólise das moléculas de água. A diferença no comportamento em termos de umidade frente à irradiação pode ser justificada, pela diferença em termos de higroscopicidade das amostras monoflorais, quando comparadas às amostras poliflorais.

Outra justificativa plausível para a obtenção de tais resultados é o ligeiro aquecimento que as amostras apresentam durante o processo de irradiação, de modo que o prolongamento

do tratamento certamente aumentaria a taxa de evaporação da água contida na amostra, gerando um resultado similar ao observado no estudo em questão.

Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) encontraram padrões de desidratação analisando 7 amostras de méis irradiadas a 10KGy semelhantes aos apresentados neste estudo, uma vez que a irradiação promoveu discreta alteração na umidade. Souza *et al.*, (2008), encontraram variações no teor de umidade mais proeminentes para méis silvestres, obtendo redução de 10% no conteúdo de água nos méis silvestres, justificando tal observação pelo arraste de água com os voláteis devido ao leve aquecimento no processo de irradiação. No presente estudo, obteve-se redução aproximada de 1%, na umidade, nas amostras de méis poliflorais silvestres.



**FIGURA 21:** Flutuações observadas para o parâmetro umidade das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

### 5.2.1.2 - Acidez livre:

A acidez livre é um importante parâmetro físico-químico de méis uma vez que em amostras não irradiadas a mesma é considerada como um indicativo de processos fermentativos. Através da observação da figura 22 e tabelas 2, 3 e 4, nota-se que houve uma queda significativa a nível de 5 % , em relação ao controle para este parâmetro, em todas as amostras irradiadas com até 15 kGy (entre 4 e 9% de redução com 15 kGy). Quando tais amostras foram submetidas à dose de 25 kGy, as amostras de méis monoflorais sofreram aumento (4 a 8%) da acidez livre, quando comparadas à condição controle e a amostra de mel polifloral silvestre seguiu reduzindo (5%) a acidez livre de forma significativa.

A queda significativa da acidez livre com doses de até 15 kGy se justifica pela promoção de reações de descarboxilação das moléculas de ácido glicônico, o principal ácido

responsável pela acidez livre de méis e conseqüente liberação de CO<sub>2</sub>, que possivelmente está relacionado a formação de espuma. Bera, Almeida-Muradian e Sabato (2009) constataram que algumas amostras quando irradiadas com 10 kGy podem sofrer redução significativa da acidez livre enquanto outras o mantêm inalterado e Souza *et al.*, (2008) verificaram que não houve alterações significativas na acidez livre em amostras de méis irradiados.

A mudança de comportamento das amostras monoflorais de eucalipto e laranjeira com 25 kGy se baseia no efeito indireto ocasionado pelo aumento abrupto de açúcares redutores livres e totais o que evidencia os efeitos da radiólise de moléculas glicídicas, especialmente di e trissacarídeos. Molins, (2001) afirma que quando ocorre a radiólise de moléculas glicídicas, além da liberação de monômeros de açúcares, uma liberação concomitante de ácido glicônico que justificaria a mudança no perfil de resposta observado. Outra justificativa para tal fato é a mesma liberação massiva de monômeros de açúcares que seriam substratos para a enzima glicose oxidase, gerando uma maior quantidade de ácido glicônico que sobrepujaria as reações de descarboxilação.

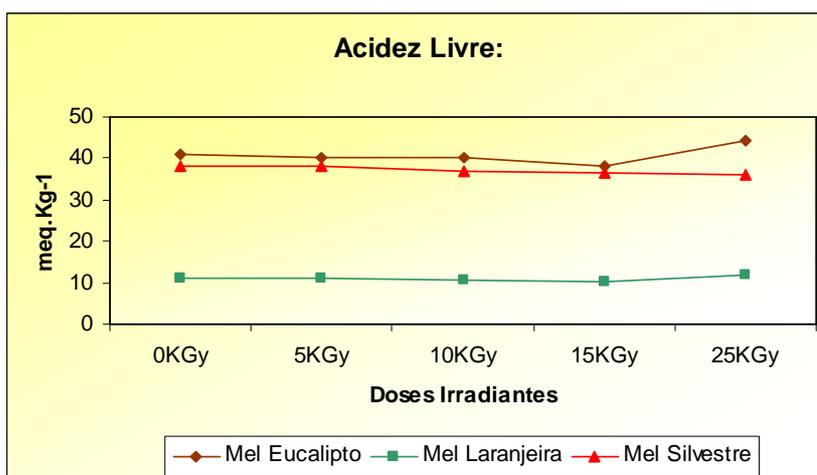
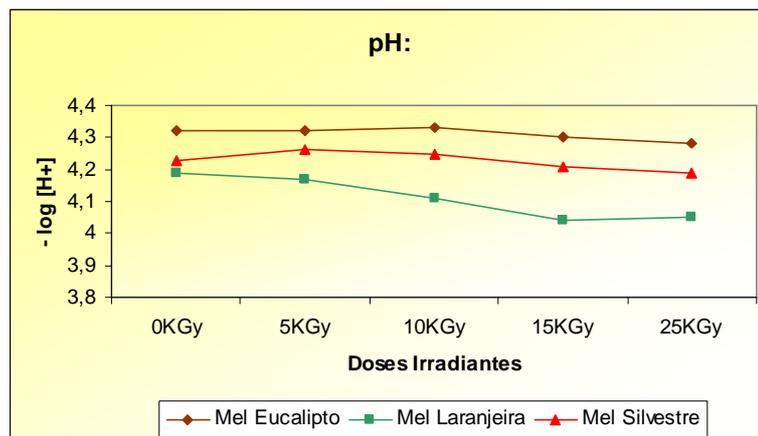


FIGURA 22: Flutuações observadas para o parâmetro acidez livre das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

### 5.2.1.3 - pH:

Conforme pode ser observado na figura 23, há uma tendência de queda do pH com a elevação da dose aplicada. Isso modifica aspectos relacionados ao desenvolvimento microbiano e atividade enzimática, e tal queda de pH é justificada pela formação de aldeídos e cetoácidos, provenientes da irradiação, fato constatado por Molins, (2001).



**FIGURA 23:** Flutuações observadas para o parâmetro pH das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

#### 5.2.1.4 - HMF:

Analisando o gráfico da figura 24 fica evidente que há um aumento da concentração em mg/Kg de HMF com o aumento da dose irradiante. De fato, através da análise das tabelas 2, 3 e 4 nota-se que os aumentos mesmos nas doses mais baixas já são significativos do ponto de vista estatístico. Tais aumentos foram de 29%, 11% e 25% para as floradas de eucalipto, laranjeira e silvestre, respectivamente, quando as mesmas foram irradiadas a 5 kGy, e para a máxima dose irradiante tais aumentos alcançaram em termos percentuais valores 75%, 153% e 100% superiores aos valores apresentados pela condição controle. As diferenças percentuais notadas sugerem que existe uma diferença na cinética de formação de HMF para cada florada, fato este ilustrado por estudos de méis não irradiados como os de Fallico *et al.*, (2004).

Tal aumento expressivo se justifica pela redução significativa do pH que propicia um aumento da cinética das reações de desidratação em meio ácido das hexoses e pelo aumento da concentração de hexoses, sobretudo em doses irradiantes mais elevadas que servem de substrato para as reações de Maillard e desidratação em meio ácido das hexoses. Além disso, há o aporte de energia e o ligeiro aquecimento que certamente favorecem a cinética deste tipo de reação potencializando a formação de HMF.

O aumento excessivo de HMF deve ser avaliado com cautela, uma vez que como mencionado anteriormente há um risco toxicológico envolvido na sua ingestão em quantidades elevadas e porque tal parâmetro é um dos mais relevantes em termos de qualidade melífera, entretanto é importante destacar que mesmo com os aumentos observados neste estudo todos os valores obtidos se encontram abaixo do limite estipulado pela legislação brasileira que resguarda a qualidade deste alimento.

Em confluência com o aspecto citado no parágrafo anterior, os estudos envolvendo irradiação de méis se apresentam bastante controversos quando se avaliam a concentração de HMF em méis irradiados. Souza *et al.*, (2008) encontraram níveis de HMF aumentados em 60% em relação a condição controle quando as amostras de méis silvestres eram irradiadas a 25 kGy, valor inferior ao encontrado durante este estudo. Migdal *et al.*, (2000) afirmam que não há alteração significativa do teor de HMF em méis irradiados a 10 kGy. Saxena, Gautam e Sharma, (2009) mostram que há comportamentos diferentes em relação a cada amostra, uma vez que foram observadas amostras que aumentaram e outras que diminuíram seu conteúdo de HMF após irradiação a 15 kGy. As conclusões obtidas por Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) se assemelham as mencionadas para Saxena, Gautam e Sharma, (2009). Portanto, a avaliação de HMF em méis irradiados ainda carece de estudos mais detalhados, principalmente em relação à sua cinética.

Para o mel de laranjeira, o teor mais baixo, desde o início da irradiação, sugere que o tempo de estocagem é um fator determinante da concentração de HMF, uma vez que este era o mais recentemente envasado.

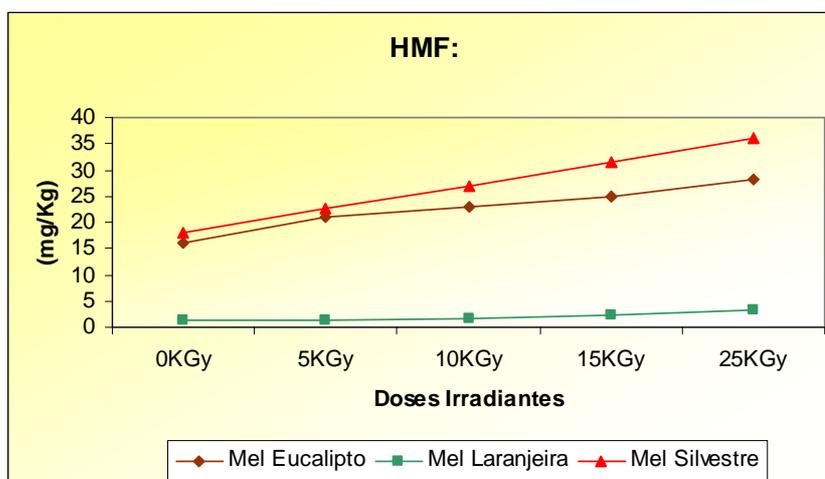


FIGURA 24: Flutuações observadas para o parâmetro HMF das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

#### 5.2.1.5 - Atividade diastásica:

Assim como a avaliação de HMF, a determinação da atividade diastásica é um parâmetro extremamente relevante na qualidade dos méis, devida à sensibilidade das enzimas diastases frente a condições de aquecimento. Além disso, a ausência reflete que o produto sofreu adulteração de forma massiva. Então, a manutenção da atividade diastásica é necessária para que o produto não tenha a sua qualidade diretamente afetada.

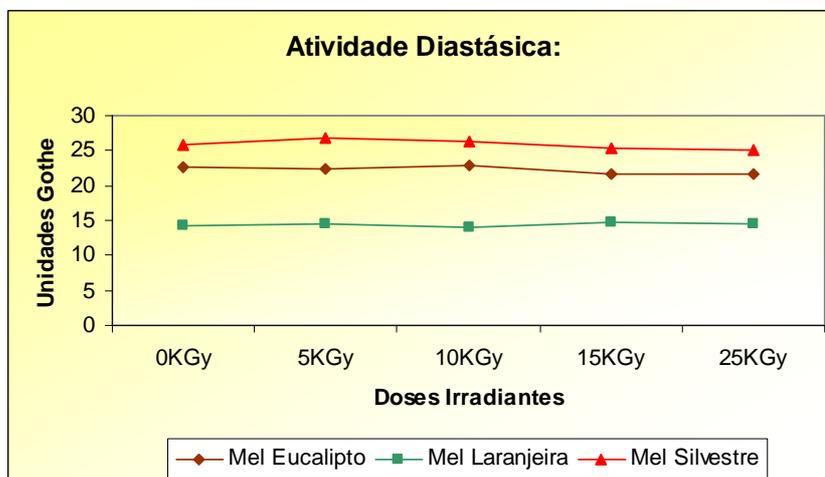
Através da avaliação do gráfico da figura 25, verifica-se que a atividade diastásica para todas as amostras sofreu discretas alterações de um modo geral.

Quando vemos os dados das tabelas 2, 3 e 4 constata-se que realmente o parâmetro atividade diastásica respondeu de forma bem homogênea à irradiação, sofrendo poucas alterações estatisticamente significativas.

Curiosamente, os méis responderam de forma distinta à irradiação. Os méis polifloral silvestre e monofloral de laranjeira não apresentaram alterações significativas do ponto de vista estatístico, o que mostra que a irradiação não comprometeu a atividade enzimática do produto. Para o mel monofloral de eucalipto a atividade diastásica sofreu uma redução significativa, principalmente quando o mel foi irradiado a 15 e 25 kGy, apesar da redução em termos percentuais ter sido menos que 5%.

Souza *et al.*, (2008) relataram aumento de 10% na atividade diastásica quando méis silvestres foram irradiados a 25 kGy, já o estudo em questão relatou aumento máximo de 4% quando se visualiza o maior acréscimo da atividade destas enzimas para o mesmo tipo de mel.

Migdal *et al.*, (2000) também afirmam que não há alterações significativas na atividade diastásica quando méis são submetidos a irradiação a 10 kGy, fato constatado para os méis silvestres.



**FIGURA 25:** Flutuações observadas para o parâmetro atividade diastásica das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

#### 5.2.1.6 - Açúcares redutores livres, açúcares redutores totais e sacarose aparente:

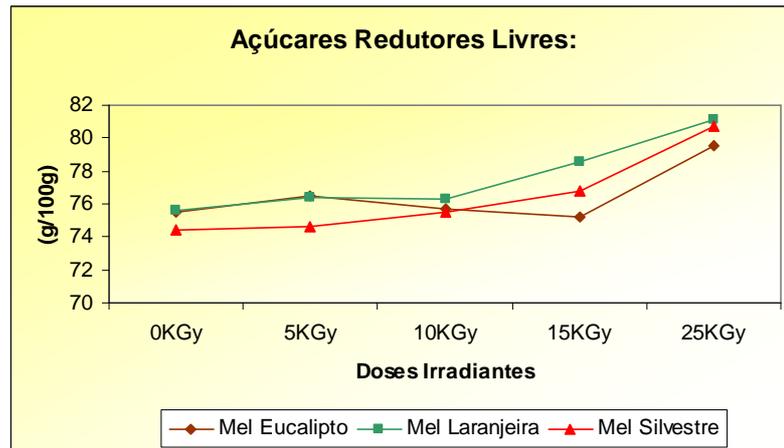
Através da análise dos gráficos das figuras 26, 27 e 28 e das tabelas 2, 3 e 4 constata-se que o comportamento dos açúcares redutores livres, açúcares redutores totais e da sacarose aparente nas amostras de distintas floradas é diferenciado. O perfil de variação de cada parâmetro citado acima é claramente visualizado nos gráficos das figuras 26, 27 e 28. Comparando os perfis de curvas das figuras 41 e 42, verifica-se que o perfil de variação de

açúcares redutores livres e redutores totais para uma mesma florada é similar. Graficamente, o que certamente denota mais atenção é a observação da ocorrência de um aumento da concentração de açúcares em ambas as propriedades físico-químicas quando irradiado a 25 kGy.

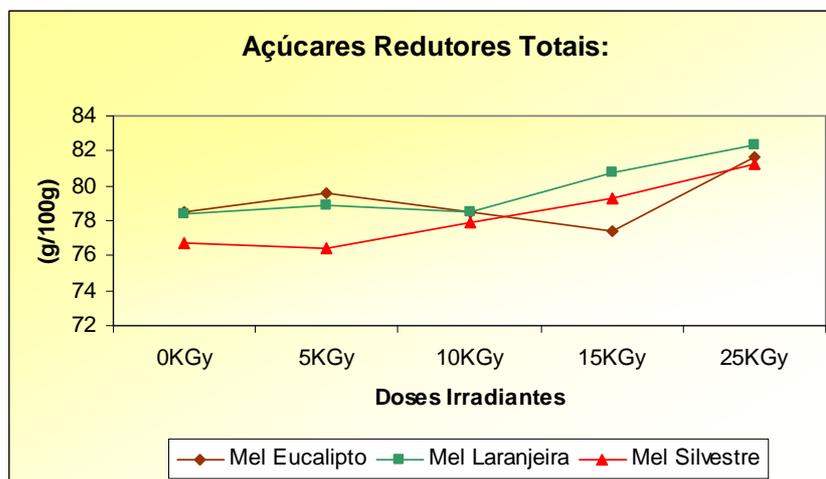
Através da análise das tabelas 2, 3 e 4, ve-se que a variação dos açúcares redutores livres, açúcares redutores totais e da sacarose aparente é mais intensa em relação ao controle quando são aplicadas doses irradiantes mais altas.

De fato, apesar de tal constatação, as floradas respondem de forma diferenciada à irradiação, de modo que a florada de eucalipto sofre alterações significativas nos parâmetros a partir de 15 kGy para tais propriedades, a florada silvestre começa a sofrer modificações mais proeminentes a partir de 10 kGy e a florada de laranjeira sofre mudanças significativas a partir de 5 kGy.

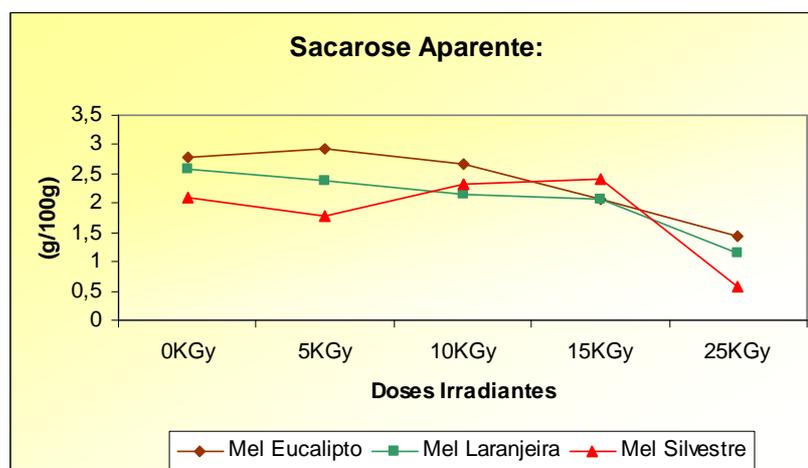
Avaliando-se a sacarose aparente, as floradas de eucalipto e silvestre sofrem alterações significativas a partir de 15 kGy, e a florada de laranjeira a partir de 10 kGy. Graficamente, novamente constata-se que a porção referente a altas doses irradiantes é a que reflete uma modificação mais proeminente quando se compara a condição controle, e neste caso em específico há uma redução do conteúdo de sacarose das amostras de méis. Tais modificações observadas em todas estas amostras se justificam pelo rearranjo de glicídios que ocorre com a irradiação que é oriunda dos fenômenos de radiólise que ocorrem nas amostras. Segundo Souza *et al.*, (2008) ocorrem diminutas variações nos teores de açúcares redutores e as flutuações são devidas ao rearranjo molecular de glicídios. Coultate, (2002) afirma que as ligações glicosídicas dos oligossacarídeos e polissacarídeos são vulneráveis, e, segundo Kilcast, (1995) a irradiação pode ser responsável pela quebra de cadeias glicídicas de alto peso molecular em unidades menores. Portanto, o incremento nas concentrações de açúcares redutores livres e açúcares redutores totais são justificados pela quebra de ligações de oligossacarídeos presentes nos méis que geram monômeros de glicose e frutose. Então, constatação análoga pode ser feita acerca do decréscimo da concentração de sacarose nas amostras, já que há o rompimento das ligações glicídicas, principalmente com altas doses. Segundo Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) há uma redução significativa da sacarose em amostras de méis irradiadas a 10 kGy e tal fato é atribuído as quebras de ligações glicosídicas com subsequente formação de ácidos modificadores do pH.



**FIGURA 26:** Flutuações observadas para o parâmetro açúcares redutores livres das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.



**FIGURA 27:** Flutuações observadas para o parâmetro açúcares redutores totais das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.



**FIGURA 28:** Flutuações observadas para o parâmetro sacarose aparente das distintas floradas em diferentes doses irradiantes.

### 5.2.1.7 - Sólidos totais (°Brix):

Quando se avaliou o parâmetro sólidos totais, verificou-se que não houve alteração do seu valor, mesmo com o uso de doses elevadas de radiação e nas diferentes floradas. Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) encontraram a mesma ausência de variação desta propriedade a 10K Gy.

### 5.2.1.8 - Resíduo mineral fixo (cinzas):

Não se observou variação significativa, do ponto de vista estatístico, para o parâmetro resíduo mineral fixo, em nenhuma das floradas em estudo. Bera, Almeida-Muradian e Sabato, (2009) verificaram o mesmo comportamento para méis irradiados com 10 kGy.

Considerando-se que o mel é um alimento minimamente processado buscaram-se tratamentos que o mantivesse mais próximo da condição original. Portanto, baseado nos resultados obtidos pelas análises físico-químicas optou-se por utilizar somente as doses irradiantes de 5 e 10 kGy, devido ao grande número de alterações significativas apresentadas pelas doses de 15 e 25 kGy, inclusive por sua elevação no teor de hidroximetilfurfural o que poderia fomentar discussões em termos de segurança alimentar.

## 5.3 - Análises microbiológicas:

### 5.3.1 - Microbiologia das amostras controle:

A tabela 5 mostra os resultados para os microrganismos especificamente pesquisados:

**TABELA 5: Contagem em UFC/g dos respectivos microrganismos específicos pesquisados para as amostras na condição controle.**

<b>Florada</b>	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Silvestre</b>	10*	60*	<10	<10
<b>Laranjeira</b>	10*	<10	<10	<10
<b>Eucalipto</b>	<10	10*	<10	<10

\*Colônias não características; valor mínimo de contagem (<10 UFC/g).

Os resultados acima evidenciam que as amostras não irradiadas não apresentavam contaminação característica para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella spp.* e

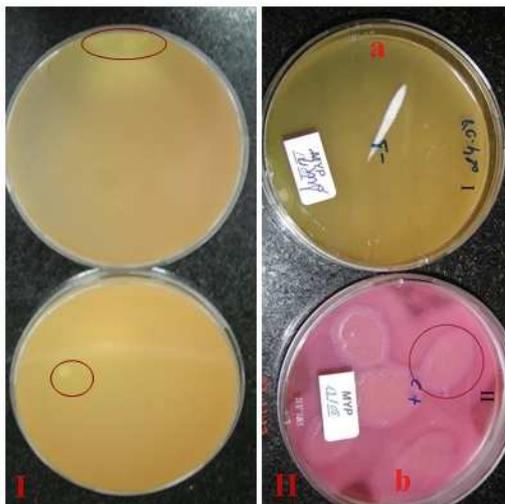
*Pseudomonas aeruginosa*. Verifica-se através da análise da tabela 5 e da figura 29 que não houve crescimento característico para *Staphylococcus aureus* no meio Baird-Parker, fato também confirmado pela execução de provas bioquímicas. Nota-se a presença de colônias atípicas com coloração acinzentada sem os halos típicos que caracterizam o crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus* (Figura 29).



**FIGURA 29:** Colônias não características acinzentadas no Ágar Baird-Parker.

A contaminação por *Staphylococcus aureus* é vista por Da Silva, Junqueira e Silveira, (2001) como indicador de contaminação pós-processo ou das condições de inocuidade das superfícies destinadas ao contato com alimentos. Portanto, os méis em questão possuem bons indicadores perante a contaminação pós-processo.

Novamente, através da avaliação das placas de Petri, contendo meios seletivos, não foi constatado crescimento característico para *Bacillus cereus* (Tabela 5), fato este confirmado por provas bioquímicas. Tal afirmação é feita em função do desenvolvimento de colônias que não possuem grandes halos de precipitação e ausência de mudança de coloração característica do meio MPY (Figura 30).



**FIGURA 30:** Placas de Petri contendo meio MPY. I: Crescimento não característico de colônias amareladas observados em duas amostras. II: Em a se observa resultado negativo para uma das amostras, e em b visualizamos o controle positivo.

A ausência de contaminação por *Bacillus cereus* é um excelente sinal de inocuidade dos méis diante de um microrganismo que freqüentemente se faz presente em amostras melíferas. Iurlina *et al.*, (2006), estudaram a prevalência de bactérias do gênero *Bacillus* em diferentes produtos coletados na Argentina e constataram que no universo de 70 amostras de méis analisadas, 27 (38,6%) apresentavam tal contaminação e 23% de todas as amostras de méis apresentavam contaminação específica por *Bacillus cereus*. López e Alippi (2007) constataram incidência de contaminação por *Bacillus cereus* de 27% em amostras de méis argentinos. Martins, Martins e Bernardo (2003) analisaram 80 amostras de méis, constatando somente 6 amostras com contagens de *Bacillus cereus* acima de  $10^3$  esporos/g. Portanto, tais resultados demonstram que a presença desta bactéria é intensa, apesar de não ter sido visualizada no estudo em questão.

Não foi constatado crescimento para *Salmonella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 5) que é extremamente relevante, uma vez que salmoneloses são bastante prevalentes e são consideradas enfermidades de alta incidência e com risco considerável em termos de saúde pública, já que são atribuídos a esta bactéria diversos surtos com óbitos. A ausência de *Pseudomonas aeruginosa* também é um aspecto bastante benéfico, uma vez que tal bactéria oportunista pode ser bastante danosa para idosos e pacientes imunocomprometidos.

Assim sendo, através da análise das amostras não se faz necessário a busca de tais bactérias nos méis irradiados devido à sua ausência. Por isso, buscou-se fazer a comparação dos efeitos da irradiação pela contagem total de bactérias mesófilas aeróbias e contagem total de fungos filamentosos e leveduras.

### 5.3.2 - Contagem total de bactérias mesófilas aeróbias:

Nas tabelas 6 e 7 visualizamos os resultados da amostra controle e das amostras irradiadas a 5 e 10 kGy.

**TABELA 6:** Contagem média em UFC/g em meios de cultura PCA para bactérias mesófilas aeróbias de méis na condição controle e irradiadas a 5 e 10 kGy.

Florada/Dose Irradiante	Controle	5KGy	10KGy
Silvestre	260	50	<10
Laranjeira	40	<10	<10
Eucalipto	1000	10	<10

Valor mínimo de contagem (<10 UFC/g).



**FIGURA 31:** Colônias visualizadas nas placas em meio PCA.

Verifica-se que as amostras controle apresentaram contaminações que variaram entre 40 UFC/g notada na florada de laranjeira e  $10^3$ UFC/g para a florada de eucalipto (Tabela 6 e Figura 31). Segundo Snowdon e Cliver (1996), a contagem padrão em placa gera uma informação geral e útil como ponto de comparação com outros dados e como indicador geral de qualidade microbiológica de méis, visão compartilhada por Franco e Landgraf (2005) que consideram os alimentos com contagens em placas de bactérias aeróbias mesófilas superiores a  $10^6$ UFC/g, massivamente contaminados.

Migdal *et al.*, (2000) estudaram os efeitos da irradiação em 7 amostras de méis encontrando contagens totais de bactérias aeróbias nas amostras controle entre  $10^1 - 4,6 \times 10^5$  UFC/g. Jo *et al.*, (2005) estudaram a microbiologia de 4 floradas de méis constatando

contagens totais de bactérias aeróbias entre 80 – 450 UFC/g e Saxena, Gautam e Sharma (2009) obtiveram valores entre 30 – 200 UFC/g.

Quando se compara a maior contagem total de bactérias aeróbias com os resultados obtidos por Migdal *et al.*, (2000) verifica-se que tal número não é elevado, por isso, os méis em estudo são considerados em linhas gerais como bons em termos de qualidade microbiológica.

A irradiação de alimentos possui como principal argumento para a difusão de seu uso a eficiente eliminação de microrganismos. Através da análise da tabela 6, nota-se que a irradiação da florada silvestre a dose de 5 kGy reduz a contagem total de bactérias aeróbias de 260 UFC/g para 50 UFC/g, ou seja, há uma diminuição significativa da contagem original da condição controle. Para a florada de laranjeira a contagem total de bactérias aeróbias atingiu o valor mínimo de menor que 10 UFC/g. Para a florada de eucalipto, a contagem original de bactérias mesófilas aeróbias da amostra controle de  $10^3$  UFC/g foi reduzida para 10 UFC/g quando tal florada é irradiada a 5 kGy. Constatou-se, então, que houve decréscimos significativos da contaminação bacteriana original da amostra controle.

Jo *et al.*, (2005) notaram reduções proeminentes deste mesmo tipo de contaminação quando as amostras eram irradiadas a 5 kGy e Saxena, Gautam e Sharma, (2009) obtiveram resultados relativos a irradiação nesta dose similares indicando redução significativa da contagem total de bactérias mesófilas.

Quando se irradia o mel com dose de 10 kGy a redução de tal contagem para as três floradas atinge valores iguais a menor que 10 UFC/g. Tais resultados estão de acordo com todas as amostras estudadas por Saxena, Gautam e Sharma (2009) que observaram o mesmo comportamento. Estão também de acordo com algumas das amostras estudadas por Migdal *et al.*, (2000) e Jo *et al.*, (2005). Possíveis diferenças observadas na resposta de eliminação de bactérias mesófilas aeróbias a irradiação se justificam pelas diferentes susceptibilidades das bactérias aeróbias mesófilas contaminantes a radiação ionizante, por este motivo algumas colônias podem sobreviver as doses de 10 kGy. De todos os modos, a irradiação mostrou uma ampla eficiência na eliminação das bactérias aeróbias mesófilas.

### 5.3.3 – Contagem total de fungos filamentosos e leveduras:

A seguir apresentaremos os resultados referentes à contagem média de fungos filamentosos e leveduras das amostras na condição controle e irradiadas a 5 e 10 kGy.

**TABELA 7: Contagem média em UFC/g de fungos filamentosos e leveduras em meio de cultura BDA de amostras de méis na condição controle e a 5 e 10 kGy.**

<b>Florada/Dose Irradiante</b>	<b>Controle</b>	<b>5kGy</b>	<b>10kGy</b>
<b>Silvestre</b>	<10	<10	<10
<b>Laranjeira</b>	70	<10	<10
<b>Eucalipto</b>	110	<10	<10

Valor mínimo de contagem (<10 UFC/g).

A contagem média de fungos filamentosos e leveduras na condição controle variou entre o valor mínimo de <10 UFC/g para a florada silvestre até 110 UFC/g para a florada de eucalipto (Tabela 7). Comparativamente com outros estudos verificou-se que Migdal *et al.*, (2000) obtiveram valores entre 0 e 900 UFC/g para fungos filamentosos e leveduras em amostras na condição controle e Silva *et al.*, (2008) observaram valores entre  $1,4 \times 10^3$  e  $2,7 \times 10^5$  UFC/g para méis não irradiados. Martins, Martins e Bernardo, (2003) encontraram baixas contagens para fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, *Mucor* e *Penicillium* (até  $10^2$  UFC/g) e altas contagens para leveduras do gênero *Saccharomyces* (entre  $10^3$ - $10^4$  UFC/g) e Jo *et al.*, (2005) não detectaram fungos filamentosos e leveduras nas quatro amostras estudadas por este grupo. Portanto, as amostras avaliadas no estudo em questão dispõem de uma boa qualidade microbiológica, uma vez que os valores notados em outros estudos são significativamente superiores.

A irradiação das floradas de eucalipto, silvestre e laranjeira a 5 kGy demonstrou uma redução significativa do número de unidades formadoras de colônias em todas estas floradas para o valor mínimo menor que 10 UFC/g. Migdal *et al.*, (2000) obtiveram resposta similar no número de UFC/g para tais microrganismos empregando a mesma dose irradiante.

Em suma, novamente a irradiação mostrou sua eficiência na eliminação de microrganismos contaminantes de méis de distintas floradas.

Através da análise dos resultados obtidos para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, fungos filamentosos e leveduras, a irradiação mostrou ser muito eficiente na

eliminação de microrganismos contaminantes de méis. Tal eliminação provém de um efeito aditivo provocado pela radiação propriamente dita que atua no DNA e nas membranas de tais microrganismos, bem como, a produção de radicais livres pela radiólise de moléculas de água que produz espécies danosas para fungos filamentosos, leveduras e bactérias (Figura 9).

#### 5.4 - Análise sensorial:

##### 5.4.1 - Teste de diferença em relação ao controle (teste triangular):

##### 5.4.1.1 – Mel monofloral de eucalipto:

A tabela 8 mostra os resultados do teste de diferença, em relação ao controle:

**TABELA 8: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis monoflorais de eucalipto durante o teste de diferença em relação ao controle.**

Provadores	Padrão	Amostra 5KGy	Amostra 10KGy	Total/Provadores
1	0	2	5	7
2	1	2	2	5
3	1	0	2	3
4	1	2	6	9
5	1	3	5	9
6	1	3	0	4
7	1	2	1	4
8	2	5	6	13
9	2	1	4	7
10	2	6	6	14
11	2	6	5	13
12	2	6	6	14
13	2	4	0	6
14	3	6	5	14
15	3	1	0	4
16	3	2	5	10
17	3	1	4	8
18	4	1	4	9
19	5	6	4	15
20	6	0	6	12
Total Amostra	45	59	76	180
Média Amostral	2,25	2,95	3,8	

Observando-se os dados da tabela 8 e analisando-a se pode avaliar o grau de similaridade ou diferença que as amostras apresentaram em relação a condição padrão apresentada durante este ensaio sensorial. De fato, se extrai tais constatações através da análise do total de escores atribuídos para cada amostra e a sua média, que será essencialmente usada no teste estatístico. Então, para o mel monofloral de eucalipto, a amostra não irradiada exibiu o menor total amostral (45), bem como a menor média (2,25), o

que evidencia que os provadores a reconheceram como a mais próxima da condição controle. Dentre as amostras irradiadas, a amostra que passou por tratamento a 5 kGy apresentou valor de total de escores superior ao controle (59) e média amostral de 2,95. Portanto, a amostra irradiada nesta condição foi reconhecida como menos similar ao controle quando comparada a amostra não irradiada. Quando se analisa a amostra que foi submetida a 10 kGy de dose irradiante verifica-se que a mesma demonstra maior grau de diferença em relação ao controle, com total de escores e média de escores de 76 e 3,8, respectivamente.

Entretanto, tal análise não possui representatividade se não for analisada estatisticamente. Para este tipo de delineamento executou-se a série de etapas descritas na sessão materiais e métodos e com o auxílio do software estatístico GRAPHPAD PRISM, obteve-se a tabela de ANOVA (Apêndice C) e executou-se o teste de Dunnett com significância de 5% para avaliar se as médias dos escores diferiam significativamente.

O apêndice C mostra a tabela de ANOVA na qual é possível verificar os resultados das somas e médias quadráticas referentes às amostras, os provadores e os resíduos bem como a soma quadrática total, bem como o valor de p que neste caso possui módulo igual a 0,0314, o que indica que as médias diferem estatisticamente, já que o valor mencionado é menor que 0,05.

Certamente, o aspecto mais relevante para a compreensão de tal tabela é a visualização do resultado atribuído ao teste de Dunnett, no qual é possível rastrear onde está localizada a comparação que atribuiu significância a diferença das médias e avaliar a diferença entre as médias de forma individual. Neste caso, as médias da amostra padrão e a amostra irradiada com 5 kGy não diferiram estatisticamente ( $p > 0,05$ ), já as médias do controle e da amostras submetida à dose de 10 kGy nota-se que há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

Por este fato, afirma-se que os provadores foram capazes de detectar diferenças entre a condição controle e a amostra irradiada a 10 kGy, uma vez que as médias dos escores tiveram diferença relevante em termos estatísticos.

#### 5.4.1.2 – Mel monofloral de laranjeira:

Realizando-se o teste de diferença em relação ao controle para o mel monofloral de laranjeira obtiveram-se os valores apresentados na tabela 9.

**TABELA 9: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis monoflorais de laranjeira durante o teste de diferença em relação ao controle.**

Provadores	Padrão	Amostra 5KGy	Amostra 10KGy	Total/Provadores
1	3	2	2	7
2	6	2	4	12
3	5	1	3	9
4	1	2	4	7
5	2	4	0	6
6	4	1	2	7
7	0	4	2	6
8	3	6	6	15
9	6	3	3	12
10	3	2	5	10
11	3	0	1	4
12	4	5	0	9
13	0	3	2	5
14	5	2	1	8
15	2	5	4	11
16	5	5	3	13
17	0	3	2	5
18	1	4	4	9
19	4	1	5	10
20	1	4	2	7
Total Amostra	58	59	55	172
Média Amostral	2,9	2,95	2,75	

A tabela 9 apresenta os escores atribuídos a cada um dos provadores para cada uma das amostras em questão. Nota-se, pela análise do total de escores amostrais, que houve um maior equilíbrio na qualificação dos provadores para as amostras, refletindo num total de escores bastante similar para todas as amostras. Certamente, o aspecto mais intrigante é o fato dos provadores atribuírem escores menores a uma amostra irradiada, neste caso, a amostra tratada com a dose de 10 kGy obteve um total de escores de 55 e média amostral de 2,75. A amostra controle obteve valores 58 e 2,9, respectivamente, e a amostra irradiada com 5 kGy valores de 59 e 2,95. Tal constatação, feita mediante a análise da tabela 9, evidencia que, possivelmente, as amostras controle e as amostras irradiadas foram consideradas bastante similares mediante avaliação dos provadores.

Novamente, procedeu-se a rota de cálculos e delineamento estatístico para a análise e avaliação dos dados observados neste teste sensorial, conforme mostrado no apêndice D.

De forma subsequente, calcularam-se as somas e médias quadráticas referentes aos parâmetros amostras, provadores, resíduos, bem como a soma quadrática total que são observados na tabela de ANOVA contida no apêndice D.

Ainda referindo-se ao apêndice D ve-se que o valor de  $p$  é de 0,9346, o que indica que as médias não diferem significativamente, ou seja, o valor de  $p$  é maior que 0,05.

Portanto, apenas por caráter confirmatório realizou-se o teste de Dunnett para as amostras de méis monoflorais de laranjeira o qual mostra que não houve diferenças estatisticamente significativas para a amostra controle e amostra irradiada a 5 kGy ( $p > 0,05$ ) e condição controle e amostra irradiada a 10 kGy ( $p > 0,05$ ), fato este que ratifica a hipótese anteriormente apresentada de que os provadores avaliaram as amostras como bastante congruentes.

#### 5.4.1.3 - Mel polifloral silvestre:

Realizando-se o teste de diferença para o mel polifloral silvestre obteve-se o conjunto de dados base mostrados na tabela 10.

**TABELA 10: Escores atribuídos pelos provadores para amostras de méis poliflorais silvestres durante o teste de diferença em relação ao controle.**

Provadores	Padrão	Amostra 5KGy	Amostra 10KGy	Total/Provadores
1	2	1	0	3
2	0	2	1	3
3	1	4	2	7
4	1	3	6	10
5	0	1	0	1
6	5	5	6	16
7	3	1	3	7
8	4	0	3	7
9	0	1	1	2
10	0	2	1	3
11	2	3	2	7
12	1	1	6	8
13	1	3	3	7
14	1	2	1	4
15	0	2	0	2
16	0	2	4	6
17	1	0	4	5
18	1	3	3	7
19	4	6	5	15
20	5	5	3	13
Total Amostra	32	47	54	133
Média Amostral	1,6	2,35	2,7	

A tabela 10 mostra os escores atribuídos pelos provadores as amostras controle e irradiadas a 5 e 10 kGy. Nota-se através da observação do total de escores amostrais e da

média amostral que a amostra na condição controle foi a que apresentou menor valor para ambos os parâmetros (32 e 1,6, respectivamente), ratificando que os provadores não treinados a reconheceram como sendo a mais similar das três amostras apresentadas ao controle. A amostra irradiada a 5 kGy obteve valor intermediários tanto para o total de escores amostrais (47) como para a média amostral (2,35), e a amostra irradiada a 10 kGy foi a que obteve maiores valores para estes atributos cujos módulos foram 54 e 2,7, respectivamente. Novamente, a amostra reconhecida como a mais distinta da condição controle segundo a qualificação dos provadores não treinados foi a amostra irradiada a 10 kGy. Entretanto, de forma semelhante aos resultados apresentados anteriormente para o teste de diferença há a necessidade de confirmar-se a existência de diferenças do ponto de vista estatístico. Por este fato, fez-se o tratamento de dados com o uso do software GRAPHPAD PRISM obtendo-se os valores contidos no apêndice E.

Portanto, através da análise dos resultados obtidos para o teste triangular nota-se que as amostras das três floradas quando irradiadas a 5 kGy não diferem significativamente das respectivas amostras controle. Contudo, há uma diferença quando se compara os resultados para as amostras irradiadas a 10 kGy na qual as amostras de méis monofloral de eucalipto e polifloral silvestre diferem significativamente da condição controle, e a amostra de mel monofloral de laranjeira não apresenta diferença em termos sensoriais. O mel monofloral de laranjeira não apresenta tal comportamento possivelmente devido a seu sabor mais suave e odor mais discreto quando comparado as outras duas amostras, dificultando a detecção organoléptica de diferenças sensoriais marcantes. Para os méis monofloral de eucalipto e polifloral silvestre procedeu-se o teste de preferência, que não foi necessário para o mel monofloral de laranjeira uma vez que a amostra controle e as respectivas amostras irradiadas a 5 e 10 kGy não diferiram sensorialmente em termos estatísticos a 5% de significância (Apêndices C, D e E).

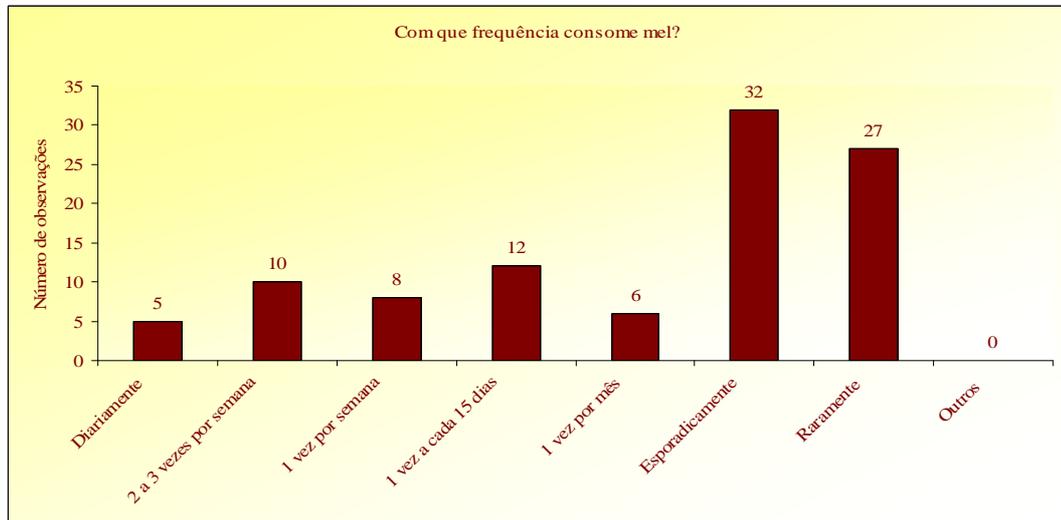
#### 5.4.3 - Teste de preferência:

##### 5.4.3.1 - Perfil do consumidor:

Para que haja o delineamento adequado de um teste de preferência robusto e bem próximo da condição real, existe a necessidade da montagem de um perfil do consumidor de méis. Neste estudo, optou-se por montar como público-alvo indivíduos jovens com média de idade de 22 anos, que não possuem renda fixa e que possuem grau de escolaridade superior incompleto, sendo o número total de indivíduos igual a 100. Tais indivíduos eram argüidos

com 5 perguntas sobre frequência e motivações de consumo. Abaixo apresentaremos os resultados do referido questionário:

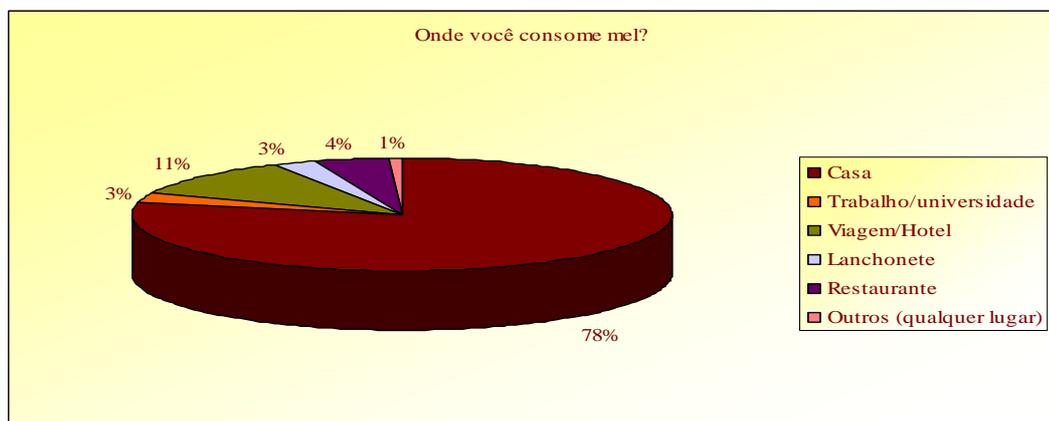
#### 5.4.3.1.1 - Frequência de consumo:



**FIGURA 32:** Histograma às respostas obtidas para frequência de consumo de méis.

Em relação ao histograma apresentado na figura 32, se verifica que há uma distribuição do público-alvo quando se considera a frequência de consumo de méis. 32 provadores mencionaram que consomem mel esporadicamente e 27 provadores afirmaram consumir o mesmo produto raramente, ou seja, 59% dos provadores não possuem uma frequência de consumo bem definida. Todavia, 41% dos provadores afirmaram consumi-lo ao menos uma vez por mês, e 5% dos indivíduos o consomem diariamente e 10% duas a três vezes por semana.

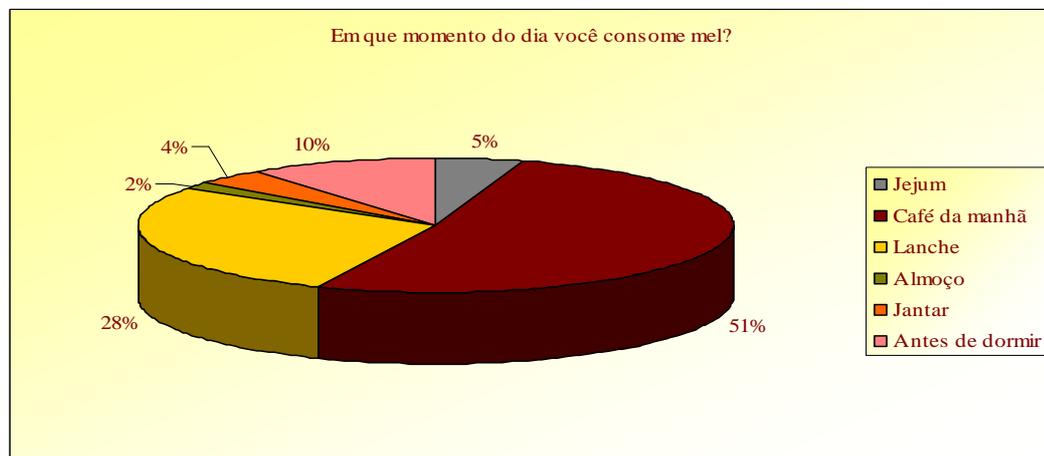
#### 5.4.3.1.2 - Localidade do consumo:



**FIGURA 33:** Gráfico referente às respostas obtidas para local de consumo de méis.

Através da análise do gráfico da figura 33, que traz os resultados da pesquisa de localização de consumo, nota-se que uma quantidade massiva dos indivíduos (78%) consome méis em seus domicílios e 11% o consomem durante viagens ou em hotéis, o que nos remete a imagem natural que o mel possui. Além disso, os provadores ainda o consomem em restaurantes (4%), em lanchonetes (3%) ou no trabalho/universidade (3%), que são formas de consumo associadas a outros tipos de alimentos como cereais e sucos. A elevada porcentagem de indivíduos que o consomem em seus domicílios, sugere que há um amplo mercado consumidor.

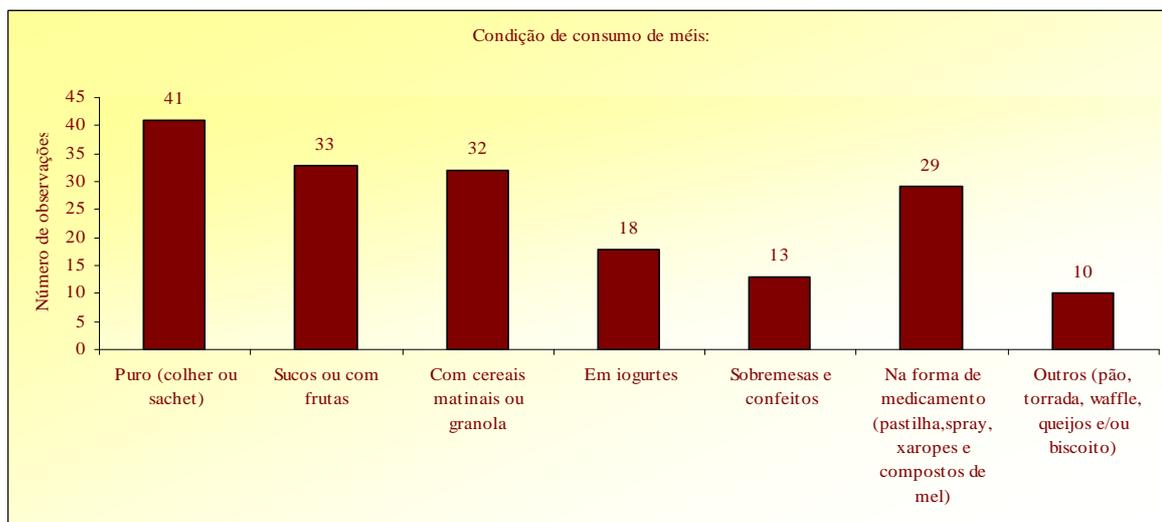
#### 5.4.3.1.3 - Horário de consumo:



**FIGURA 34:** Gráfico referente às respostas obtidas para horário de consumo de méis.

O gráfico da figura 34 ilustra o momento do dia em que ocorre o consumo de méis de acordo com os provadores. Segundo os dados obtidos, 51% dos indivíduos consomem méis no café da manhã, 28% o consomem no lanche, 10% consomem este alimento antes de dormir e 5% curiosamente o consomem em jejum.

#### 5.4.3.1.4 - Condição de consumo:

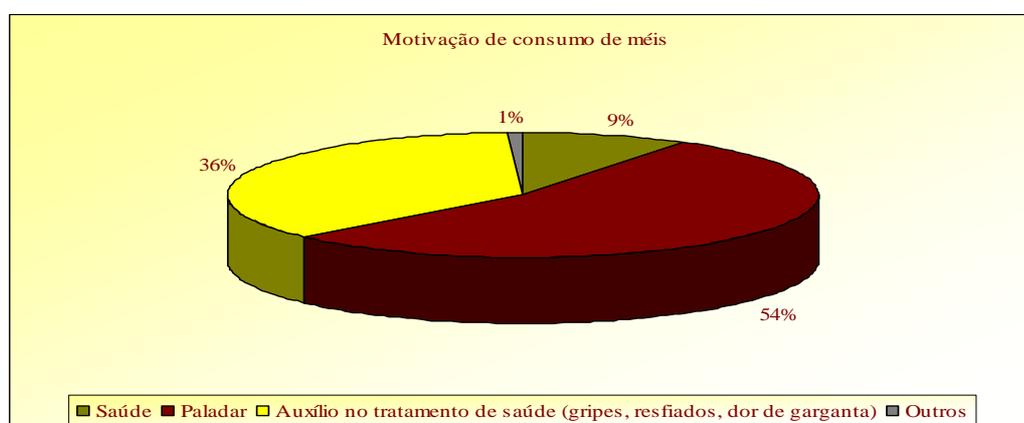


**FIGURA 35:** Histograma referente às respostas obtidas para condição de consumo de méis.

Como se constata pela observação do histograma da figura 35, as condições de consumo de méis são extremamente diversas e complexas, fato este constatado pela multiplicidade de respostas e pelo espalhamento do número de observações.

23% do número de observações mostram o consumo do produto puro, seja em colher ou “sachet”, 18,7% denotam o consumo com sucos ou com frutas, 18,2% afirmam que consomem méis com cereais matinais ou granola, 16,5% o consomem sobre diferentes apresentações na forma de medicamento, o que mostra que o mel ainda possui um caráter fortemente vinculado aos produtos naturais usados na medicina tradicional brasileira.

#### 5.4.3.1.5 - Motivações atribuídas ao consumo:



**FIGURA 36:** Gráfico referente às respostas obtidas para motivação de consumo de méis.

Quando se analisa, especificamente, a motivação de consumo dos méis (figura 36), nota-se que 54% dos indivíduos consomem tal alimento por questões de paladar, ou seja, por

considerarem o seu consumo sensorialmente desejável; 36% afirmam consumir méis para o auxílio nos tratamentos de saúde, refletindo novamente a importância deste alimento na etnomedicina e 9% afirmam que a principal motivação para o consumo de mel se dá por questões associadas diretamente à saúde.

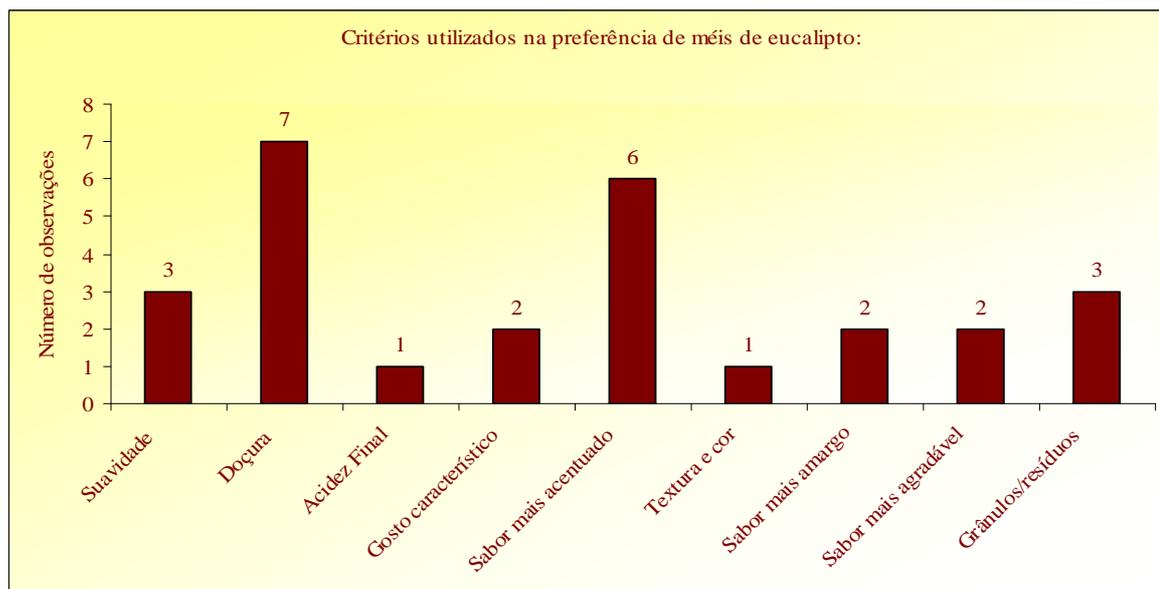
#### 5.4.3.2 - Mel monofloral de eucalipto:



**FIGURA 37:** Gráfico referente ao resultado do teste de preferência para os méis monoflorais de eucalipto.

A referida análise sensorial revelou que 78% dos provadores preferem o mel na condição controle quando este é confrontado com a amostra irradiada com 10 kGy (Figura 37). Em termos estatísticos e segundo o embasamento metodológico, para que possa afirmar com exatidão que há predileção para uma amostra no referido ensaio ao menos 32 pessoas, ou seja, 64% dos provadores devem se posicionar a favor de uma amostra. Baseado nesta afirmação pode-se ratificar que as pessoas preferem a amostra na condição controle.

Sabendo-se que se tratava de um ensaio optativo, os indivíduos eram encorajados a comentários sobre as suas escolhas, e comentários seriam importantes na obtenção de uma justificativa geral dos critérios de escolha. Então, reuniram-se os critérios que justificassem as escolhas para o teste de preferência no gráfico da figura 38.



**FIGURA 38:** Histograma referente aos critérios de preferência obtidos para méis monoflorais de eucalipto.

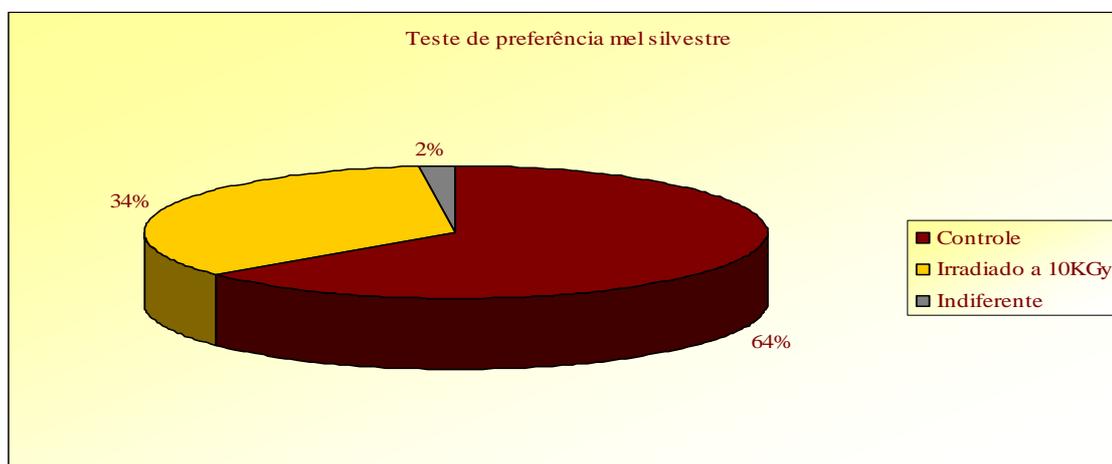
Houve uma taxa de explicitação dos critérios de escolha de 54%, o que é um valor bastante expressivo. Então, dos 27 comentários reunidos acerca das escolhas, 7 (25,9%) deles mencionaram a doçura como parâmetro decisivo na escolha de uma das amostras, 6 (22,2%) deles relataram que a amostra irradiada tinha sabor mais acentuado e 3 (11,1%) relatavam que a amostra controle apresentava maior suavidade quando comparada a amostra irradiada, além disso 3 comentários relatavam grânulos ou resíduos na amostra irradiada, provavelmente oriundos da espuma residual que ainda estava presente no mel, provado pelos mesmos. Outras respostas comumente, também relatadas, se relacionavam com a acidez final da amostra irradiada, gosto característico da amostra controle, diferenças entre textura e cor das amostras, sabor mais amargo da amostra irradiada e sabor mais agradável da amostra controle.

Vinculam-se algumas das observações constatadas pelos provadores com algumas alterações físico-químicas que ocorreram ou poderiam ocorrer nas amostras irradiadas. A diferença de doçura pode ser explicada pelo discreto aumento nos açúcares redutores livres e ligeira redução da sacarose aparente da amostra que foi submetida à irradiação. As diferenças gustativas das amostras irradiadas em relação ao controle podem ser justificadas pela perda de voláteis ocasionada pela irradiação, o que pode trazer sensações de ausência de gosto características como amargor e acidez em comparação a suavidade e ao sabor característico das amostras na condição original. O sabor acentuado das amostras controle quando comparadas a amostra irradiada se atribui a este mesmo fenômeno.

A diferença de textura é atribuída a possíveis mudanças na viscosidade oriundas do processo de irradiação, uma vez que foi constatado empiricamente que há uma diferença visual neste parâmetro físico-químico.

A cor também sofre ligeira alteração, o que constatado por um reduzido número de provadores. As diferenças em termos de acidez se justificam por alterações significativas da acidez livre, ligeiras modificações no pH e geração de produtos ácidos da quebra de ligação glicosídicas, principalmente a quebra das moléculas de sacarose e radiólise de moléculas protéicas geram cetoácidos e aldeídos.

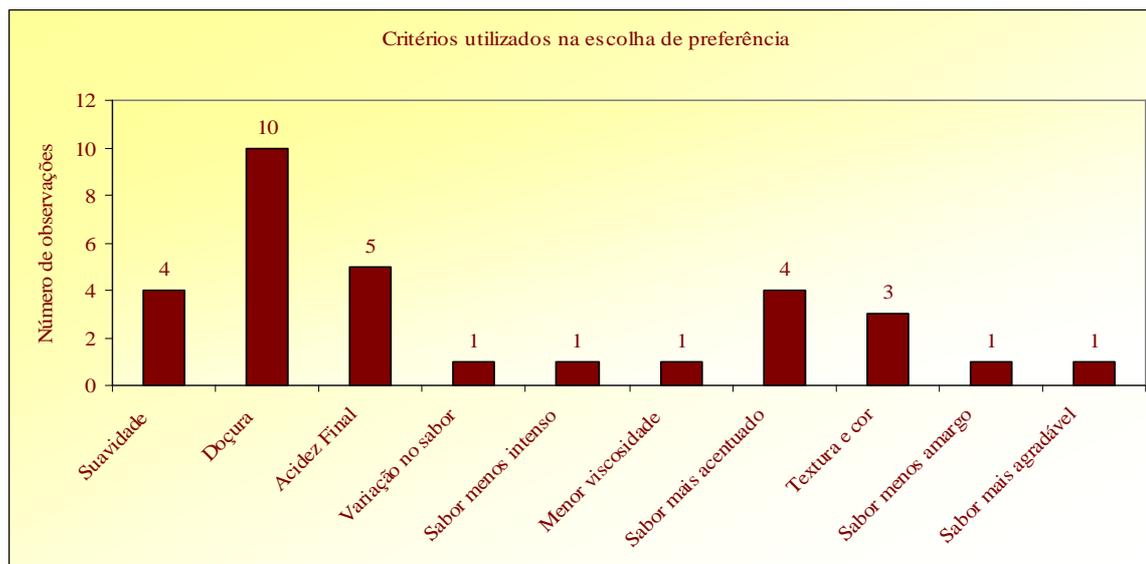
#### 5.4.3.3 - Mel polifloral silvestre:



**FIGURA 39:** Gráfico referente ao resultado do teste de preferência para os méis poliflorais silvestres.

O teste de preferência, para os méis poliflorais silvestres, revelou que 64% dos provadores preferem a amostra em suas condições originais, 34% preferem a amostra irradiada e 2% são indiferentes (Figura 39). Então, novamente pode-se afirmar que há uma predileção dos indivíduos para a amostra na condição controle, uma vez que, pelo menos, 32 pessoas optaram por uma das amostras.

Subsequentemente buscou-se verificar quais foram os critérios de escolha envolvidos na opinião dos provadores que aprovavam ou desaprovavam uma das amostras em estudo. De posse desses dados, reuniram-se as informações dos campos de comentários das fichas e gerou-se o histograma apresentado na figura 40.



**FIGURA 40:** Histograma referente aos critérios de preferência obtidos para os méis poliflorais silvestres.

Houve uma taxa de comentários de 62%, o que denota um valor altamente expressivo (Figura 40). Então, dos 31 comentários, 10 foram relativos ao parâmetro doçura da amostra irradiada como sendo relevante nas escolhas feitas pelos provadores, 5 indivíduos relataram que a amostra irradiada possuía acidez final, 4 provadores afirmaram que a amostra controle era mais suave, 4 indivíduos trazem o sabor mais acentuado das amostras como critério de escolha e 3 indivíduos afirmam que há diferença em textura e cor entre as amostras. Além disso, foram também constatadas diferenças no sabor, mudança na viscosidade e no sabor.

De todos os modos, notam-se de modo análogo ao que ocorreu durante o teste de preferência para o mel monofloral de eucalipto, os provadores usaram critérios bastante complexos de justificativa. Na tentativa de analisar tais critérios, compararam-se os relatos com alguns resultados das análises físico-químicas.

Os comentários acerca da diferença de doçura entre a amostra controle a amostra irradiada se justificam pelo aumento significativo do conteúdo de açúcares redutores livres e açúcares redutores totais na amostra irradiada, fazendo com que a mesma seja reconhecida sensorialmente como mais doce. A acidez final da amostra irradiada é atribuída ao desbalanço entre acidez livre, pH e geração de ácidos por reações de radiólise que modificam sensorialmente a palatabilidade destas amostras. A suavidade e o sabor acentuado da amostra controle frente a modificações gerais no sabor da amostra irradiada se justificam pela perda de voláteis gerada pela irradiação que pode ter repercussões em nível sensorial. Modificações na textura e cor são possíveis uma vez que foi determinado empiricamente que as amostras têm sua viscosidade e cor alteradas após sofrerem a irradiação.

## 6 – CONCLUSÕES:

- Nos parâmetros físico-químicos, as amostras das três floradas de laranjeira, eucalipto e silvestre atenderam os parâmetros exigidos na Instrução Normativa nº 11 de 2000 do MAPA, comprovando a idoneidade do fornecedor.
- Os resultados da avaliação físico-química das amostras irradiadas sugerem que há uma relação linear direta entre o aumento da dose irradiante e as alterações dos parâmetros avaliados estatisticamente significativas.
- Os resultados da avaliação físico-química para os parâmetros açúcares redutores livres, açúcares redutores totais e sacarose aparente das amostras irradiadas sugerem que existe um rearranjo complexo de glicídios e despolimerização, principalmente em altas doses irradiantes.
- Em termos de perfil microbiológico, as amostras controle de méis monoflorais de laranjeira e eucalipto e polifloral silvestre apresentaram ausência de microrganismos especificamente investigados e reduzido número de bactérias aeróbias mesófilas, fungos filamentosos e leveduras, indicando oferta de um alimento seguro.
- As amostras irradiadas com 5 e 10 kGy, das floradas estudadas, reduziram significativamente a quantidade de microrganismos contaminantes, mostrando a eficiência da irradiação para esta finalidade.
- Os resultados das avaliações sensoriais, através do teste de diferença em relação ao controle demonstram que:
  1. As amostras de mel (laranjeira, eucalipto e silvestre) irradiadas a 5 kGy não apresentam alterações sensoriais significativas ao nível de 5% quando comparadas a amostra controle.
  2. Os méis polifloral silvestre e monofloral de eucalipto quando irradiados a 10 kGy diferem significativamente ao nível de 5% em relação a amostra controle (não irradiada).
  3. O mel monofloral de laranjeira irradiado na dose de 10 kGy não apresentou diferença significativa a 5% em relação a amostra controle (não irradiada).
- A avaliação sensorial do teste de preferência, das amostras controle de mel silvestre e eucalipto e irradiadas a 10 kGy indicaram uma predileção para as amostras na condição controle frente às amostras irradiadas a 10 kGy.

Existem múltiplos critérios coletados que justificam esta preferência, sendo as principais modificações no sabor, na doçura e na acidez do produto.

- O perfil do consumidor mostra que os consumidores ingerem mel devido aos seus aspectos sensoriais peculiares e por questões ligadas a saúde, e este consumo se dá das mais diversas formas e acontece geralmente em seus domicílios no café-da-manhã e lanche e com frequência esporádica.
- Os resultados dos ensaios físico-químicos, microbiológicos e sensoriais indicam que a irradiação de méis a 5 kGy apresenta pequenas alterações nos parâmetros físico-químicos, alta capacidade de redução da carga microbiana e manutenção das propriedades sensoriais e originalidade do produto.

## **7 – PERSPECTIVAS FUTURAS:**

Para a continuidade deste trabalho sugerem-se estudos aprofundados sobre o efeito da irradiação nos compostos bioativos presentes no mel, com especial atenção ao conteúdo enzimático, poder antioxidante, intermediários da reação de Maillard, efeito bactericida, agentes prebióticos e a biodisponibilidade destes compostos, além de estudos que comparem o efeito da irradiação com os outros métodos térmicos (ultrassom e aquecimento ôhmico) ou não-térmicos (alta pressão) em termos de redução da carga microbiana no mel.

Outro foco de estudo destaca a avaliação da vida de prateleira do mel após a irradiação visando à garantia da segurança deste produto e manutenção de suas propriedades nutricionais.

## 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRAMOVIC, H.; JAMNIK, M.; BURKAN, L.; KAC, M. Water Activity and Water Content in Slovenian Honeys. **Food Control**, v.19, n.11, p. 1086-1090, 2008.

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

AJLOUNI, S.; SUJIRAPINYOKUL, P. Hydroxymethylfurfuraldehyde and Amylase Contents in Australian Honey. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1000-1005, 2010.

ALLIPI, A.M.; REYNALDI, F.J. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae* the causal agent of American foulbrood of honeybees, by selected strains of aerobic spore-forming bacteria isolated from apiarian sources. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.91, p. 141-146, 2006.

ALONSO-TORRE, S.R.; CAVIA, M.M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; MORENO, G.; HUIDOBRO, J.F.; SANCHO, M.T. Evolution of Acid Phosphatase Activity of Honeys from Different Climates. **Food Chemistry**, v.97, n.4, p. 750-755, 2006.

AL-QASSEMI, R.; ROBINSON, R.K. Some Special Nutritional Properties of Honey – A Brief Review. **Nutrition & Food Science**, v.33, n.6, p. 254-260, 2003.

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características Físico-Químicas de Amostras de Mel de *Melipona mandacaiia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p. 644-650, 2005.

ALVES, M.A.M.; DELLA MODESTA, R.C.; SOUZA E SILVA, A.L. **Desenvolvimento do Perfil Sensorial de Méis Silvestres (*Apis mellifera*) de Vários Municípios do Estado de Alagoas**. Comunicado Técnico. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ISSN 0103-5231, Rio de Janeiro, Agosto de 2005.

ANUPAMA, D.; BHAT, K.K.; SAPNA, V.K. Sensory and Physico-chemical Properties of Commercial Samples of Honey. **Food Research International**, v.36, n.2, p. 183-191, 2003.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Informe Técnico nº 37 de 28 de julho de 2008. **Botulismo Intestinal**.

Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/37\\_280708.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/37_280708.htm)>. Acesso em: 04 mai. 2010.

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

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4. ed. Washington DC.. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.357-380.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S.R.C.; DUCATTI, C.; SILVA, E.T.; VENTURINI FILHO, W.G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade Isotópica do Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em Méis Brasileiros Utilizando sua Proteína como Padrão Interno. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.4, p. 299-304, 2008a.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S.R.C.; DUCATTI, C.; SILVA, E.T.; VENTURINI FILHO, W.G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade Isotópica do Nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ ) e do Carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) em Proteína de Méis Brasileiros. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.11, n.3, p. 190-193, 2008b.

ARNAUD, A.F.; DA SILVA, R.A.; ARAÚJO, L.L.S.; JÚNIOR, R.J.S.; JÚNIOR, D.A.O. Perfil Sensorial de Méis de *Apis mellifera L.*, 1758 (*Hymenoptera, Apidae*) Produzidos na Microrregião de Catolé do Rocha – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.3, n.4, p. 73-85, 2008.

ARNON, S.S.; MIDURA, T.F.; DAMUS, K.; THOMPSON, B.; WOOD, R.M.; CHIN, J. Honey and other environmental risk factors for infant botulism. **Journal of Pediatrics**, v.94, p. 331–336, 1979.

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, 16<sup>th</sup> ed., Rev. 4<sup>th</sup> ed., 1998.

AZEREDO, L.C.; AZEREDO, M.A.A.; DE SOUZA, S.R.; DUTRA, V.M.L. Protein Contents and Physicochemical Properties in Honey Samples of *Apis mellifera* of Different Floral Origins. **Food Chemistry**, v.80, n.2, p. 249-254, 2003.

BAKHIYA, N.; MONIEN, B.; FRANK, H.; SEIDEL, A.; GLATT, H. Renal organic anion transporters OAT1 and OAT3 mediate the cellular accumulation of 5-sulfoxymethylfurfural, a reactive, nephrotoxic, metabolite of the Maillard product 5-hydroxymethylfurfural. **Biochemical Pharmacology**, v.78, p. 414-419, 2009.

BAM. **Bacteriological Analytical Manual**, 8<sup>th</sup> ed., Rev. A, 1998.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. *Bacillus cereus*. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins (The Bad Bug Book)**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 2002a. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 02 out. 2009.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. *Clostridium botulinum*. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins (The Bad Bug Book)**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 2002b. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 02 out. 2009.

BAM. Bacteriological Analytical Manual. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins (The Bad Bug Book)**. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S. Food and Drug Administration. 2002c. Disponível em: <<http://www.fda.gov>>. Acesso em: 02 out. 2009.

BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Microbiological Quality of Some Retail Spices in India. **Food Research International**, v.36, p. 469–474, 2003.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Science Agriculture**, v.61, n.3, p. 342-350, 2004.

BARTH, M.O.; MAIORINO, C.; BENATTI, A.P.T.; BASTOS, D.H.M. Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e da Origem Botânica de Méis Indicados Monoflorais do Sudeste do Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.2, p. 229-233, 2005.

BASKARAN, R.; DEVI, A.U.; NAYAK, C.A.; KUDACHIKAR, V.B.; PRAKASH, M.N.K.; PRAKASH, M.; RAMANA, K.V.R.; RASTOGI, N.K. Effect of Low-Dose Gamma-Irradiation on the Shelf Life and Quality Characteristics of Minimally Processed Potato Cubes Under Modified Atmosphere Packaging. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n.6, p. 1042-1049, 2007.

BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; DA SILVA, M.A.A.P.; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. Composição de Voláteis e Perfil de Aroma e Sabor de Méis de Eucalipto e Laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p. 122-129, 2002.

BEHRENS, J.H.; BARCELLOS, M.N.; FREWER, L.J.; NUNES, T.P.; LANDGRAF, M. Brazilian consumer views on food irradiation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p. 383-389, 2009.

BENDINI, J.N.; SOUZA, D.C. **Análise sensorial do mel proveniente da florada de cajueiro**. 2008. Disponível em: <<http://www.apis.sebrae.com.br>>. Acesso em: 10 ago. 2009.

BENKEBLIA, N.; ONODERA, S.; SHIOMI, N. Effect of Gamma Irradiation and Temperature on Fructans (Fructo-oligosaccharides) of Stored Onions Bulbs *Allium cepa* L. **Food Chemistry**, v. 87, p. 377-382, 2004.

BENNETT, R.W.; MONDAY, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: **International Handbook of Foodborne Pathogens**. MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. Marcel Dekker Inc. New York, p. 53-71, 2003.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Propriedades Físico-Químicas de Amostras Comerciais de Mel com Própolis do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.1, p. 49-52, 2007.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; SABATO, S.F. Effect of Gamma Irradiation on Honey Quality Control. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, n.7-8, p. 583-584, 2009.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the Phenolic Content, Antioxidant Activity and Colour of Slovenian Honey. **Food Chemistry**, v.105, p. 822-828, 2007.

BOBBIO, P.A. ; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos**. 2ª edição, Livraria Varela LTDA, 1995, 151p.

BOGDANOV, S. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.30, n.7, p. 748-753, 1997.

BOGDANOV, S.; HALDIMANN, M.; LUGINBUHL, W.; GALLMANN, P. Minerals in Honey: environmental, geographical and botanical aspects. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v.46, n.4, p. 269-275, 2007.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 21 de 26 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para a Irradiação de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 29 de janeiro de 2001. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 27 de set. 2009.

BRASIL. COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS (CNNPA). Resolução nº12 de 1978. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas para efeito em todo território nacional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 24 de julho de 1978. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 27 de set. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº11 de 20 de outubro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 out, 2000. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 28 de set. 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2008. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 04 mai. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Botulismo – Aspectos Epidemiológicos**. 2009. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 04 mai. 2010.

BREWER, M.S. Irradiation Effects on Meat Flavor: a review. **Meat Science**, v. 81, n. 1, p. 1-14, 2009.

BRIGIDE, P. **Disponibilidade de ferro em grãos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris L.*) irradiados**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo, 2002.

BUCKENHUSKES, H.J.; RENDLEN, M. Hygienic Problems of Phytogetic Raw Materials for Food Production With Special Emphasis to Herbs and Spices. **Food Science and Biotechnology**, v. 13, p. 262–268, 2004.

CAMARGO, R.J.; TADINI, C.C.; SABATO, S.F. Physical-Chemical Analyses of Irradiated Papayas (*Carica papaya L.*). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1866-1868, 2007.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R.C.; SILVA, T.J.P.; BAPTISTA, K.E.; GOMIDES, M.F.; GODOY, R.L. Classificação do Mel em Floral ou Mel de Melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.1, p. 1-5, 2003.

CANO, C.B.; FELSNER, M.L.; BRUNS, R.E. Precisão dos Métodos Refratométricos para Análise de Umidade em Mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p. 328-332, 2007.

CARDELLO, A.V. Consumer concerns and expectations about novel food processing Technologies: effects on product liking. **Appetite**, v.40, n.3, p. 217-233, 2003.

CARDELLO, H.M.A.B.; CARDELLO, L. Teor de Vitamina C, atividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (*Mangífera indica L.*) var. *haden*, durante o amadurecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.2, p. 211-217, 1998.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an Old Remedy Used in Modern Medicine. **Fitoterapia**, v.73, S1-S6, 2002.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GUCHU, E.; PÉREZ-COELLO, M.S. Analysis of Volatile Compounds of Eucalyptus Honey by Solid Phase Extraction Followed by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. **European Food Research and Technology**, v.224, n.1, p. 27-31, 2006a.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; PÉREZ-COELLO, M.S.; CABEZUDO, M.D. Analysis of Volatile Compounds of Rosemary Honey. Comparison of Different Extraction Techniques. **Chromatographia**, v.57, n.3-4, p. 227-233, 2006b.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A.; PÉREZ-COELLO, M.S. Differentiation of Monofloral Citrus, Rosemary, Eucalyptus, Lavender, Thyme and Heather Honeys Based on Volatile Composition and Sensory Descriptive Analysis. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p. 1022-1030, 2009.

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 Chemistry**, v.78, p. 157-161, 2002.

CAVIA, M.M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; HUIDOBRO, J.F.; SANCHO, M.T. Correlation Between Moisture and Water Activity of Honeys Harvested in Different Years. **Journal of Food Science**, v.69, n.5, p. C368-C370, 2004.

CAVIA, M.M.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; ALONSO-TORRE, S.R.; HUIDOBRO, J.F.; SANCHO, M.T. Evolution of Acidity of Honeys from Continental Climates: influence of induced granulation. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p. 1728-1733, 2006.

CAVIA, M.M.; ÁLVAREZ, C.; HUIDOBRO, J.F.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M.A.; SANCHO, M.T. Evolution of Hidroxymethylfurfural Content of Honeys From Different Climates: influence of induced granulation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.59, n.1, p. 88-94, 2008.

CCR. CENTER FOR CONSUMER RESEARCH. **Food irradiation, History of Food Irradiation**. 2001. Disponível em: <<http://ccr.ucdavis.edu/irr/history.shtml>>. Acesso em: 25 set. 2009.

CDC. CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Summary of Notifiable Diseases – United States 2006**. 2008. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 23 ago. 2009.

CENTORBI, H.J.; ALIENDRO, O.E.; DEMO, N.O.; DUTTO, R.; FERNANDEZ, R.; CENTORBI, O.N.P. First case of infant botulism associated with honey feeding in Argentina. **Anaerobe**, v.5, p. 181-183, 1999.

CHAWLA, S.P.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. **Food Chemistry**, v.116, p. 122-128, 2009.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M.; ZANGERL, A.R.; ENGESETH, N.J. Honeys from Different Floral Sources as Inhibitors of Enzymatic Browning in Fruits and Vegetable Homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 4997-5000, 2000.

CHIRIFE, J.; ZAMORA, M.C.; MOTTO, A. The Correlation Between Water Activity and % Moisture in Honey: fundamental aspects and application to Argentine honeys. **Journal of Food Engineering**, v.72, n.3, p. 287-292, 2006.

CHRISTIANSSON, A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: Factors affecting the contamination of milk during the grazing period. **Journal of Dairy Science**, v.82, p. 305–314, 1999.

CIAPINNI, M.C. Identificación y Selección de Descriptores para Establecer el Perfil Completo de Mieles. **Alimentaria**, n. 337, p. 141-146, 2002.

CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **CAC/VOL III**, Suppl. 2. ed. 1. Roma: FAO/WHO, 1990.

CENA. CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA. **Divulgação da Tecnologia da Irradiação de Alimentos e Outros Materiais – Equipamentos para Irradiação de Alimentos e/ou Outros Materiais**. 2002a. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/equipamentos.htm>> . Acesso em: 27 jun. 2009.

CENA. CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA. **Divulgação da Tecnologia da Irradiação de Alimentos e Outros Materiais – Princípios da Irradiação**. 2002b. Disponível em: <<http://www.cena.usp.br/irradiacao/equipamentos.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2009.

CNEN. COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. **Radiações ionizantes e a vida**. Disponível em: <[http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad\\_ion.pdf](http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2009.

COSENTINO, S.; MULARGIA, A.F.; PISANO, B.; TUVERI, P.; PALMAS, F. Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v.38, p. 235-238, 1997.

CORBELLA, E.; COZZOLINO, D. Classification of the Floral Origin of Uruguayan Honeys by Chemical and Physical Characteristics Combined with Chemometrics. **Food Science and Technology**, v.39, n.5, p.534-539, 2006.

CORBO, M.R.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Prolonging Microbial Shelf Life of Foods Through the Use of Natural Compounds and Non-Thermal Approaches – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p. 223-241, 2009.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D.S. Analyse Pollinique, Propriétés Physico-chimiques et Action Antibactérienne des Miels d'abeilles Africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés Du Brésil. **Apidologie**, v.22, p. 61-73, 1991.

COULTATE, T.P. **Food: the chemistry of its components**. The Royal Society of Chemistry, 4<sup>a</sup> edição, 2002, 432 p.

CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. Heinemann, ISBN 0434902705, 1975, 608p.

CRANE, E. **O Livro do Mel**, São Paulo SP, Livraria Nobel S.A., 1980, 226p.

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.

CROCI, C.A.; BANEK, A.; CURZIO, O.A. Effect of Gamma-Irradiation and Extended Storage on Chemical Quality in Onion (*Allium cepa* L.). **Food Chemistry**, v.54, p. 151-154, 1995.

D'AGUILA, P.S.; ROQUE, O.C.C.; MIRANDO, C.A.S.; FERREIRA, A.P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, n.3, p. 791-798, 2000.

D'INNOCENZO, M.; LAJOLO, F.M. Effect of Gamma Irradiation on Softening Changes and Enzyme Activities During Ripening of Papaya Fruit. **Journal of Food Biochemistry**, v.25, n.5, p. 425-438, 2007.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 2<sup>a</sup> edição, Livraria Varela, São Paulo, 2001, 317p.

DAUPHIN, J-F.; SAINT-LÈBE, L.R. *Radiation Chemistry of Carbohydrates*. IN: **Radiation Chemistry of Major Food Components**, ELIAS, P.S.; COHEN, A.J., Elsevier Scientific, Amsterdam, p. 131-220, 1977.

DE ALMEIDA, W.M. **Radiossensibilidade de Esporos de *Paenibacillus larvae subsp. larvae* em Mel**. Dissertação (Especialização), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2006.

DE TOLEDO, T.C.F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V.; PIEDADE, S.M.S. Effects of Gamma Radiation on Total Phenolics, Trypsin and Tannin Inhibitors in Soybean Grains. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 1653-1656, 2007.

DELINCÉE, H.; RADOLA, B.J. Structural Damage of Gamma-irradiated ribonuclease revealed by thin-layer isoelectric focusing. **International Journal of Radiation**, v.28, p. 565-579, 1975.

DELINCÉE, H. Recent advances in radiation chemistry of proteins. IN: **Recent Advances in Food Irradiation**. ELIAS, P.S.; COHEN, A.J., Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, p. 89-114, 1983.

DELMAS, C.; VIDON, D.J.M.; SEBALD, M. Survey of Honey for *Clostridium botulinum* Spores in Eastern France. **Food Microbiology**, v.11, n.6, p. 515-518, 1994.

DERUITER, F.E.; DWYER, J. Consumer Acceptance of Irradiated Foods:dawn of a new era? **Food Service Technology**, v.2, p. 47-58, 2002.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods**. New York: Marcel Dekker, 1990, ISBN 082478137-6, 345p.

DIEHL, J.F. Food Irradiation: past, present and future. **Radiation Physics and Chemistry**, v.63, p. 195-214, 2002.

DRAGANIC, I.G. Radiolysis of Water: a look at its origin and occurrence in the nature. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 181-186, 2005.

DROBNIIEWSKI, F.A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology**, v.6, p. 324–338, 1993.

DURLING, L.J.K.; BUSK, L.; HELLMAN, B.E. Evaluation of the DNA damaging effects of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cells lines with different activities of sulfotransferases. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p. 880-884, 2009.

EHLERMANN, D.A.E. Food Irradiation. In: SPIESS, W.E.L.; SCHUBERT, H. (Ed). **Engineering and food: Preservation processes and related techniques**. London: Elsevier Applied Science, 1990. v.2, p. 760-773.

ESTI, M; PANFILI, G.; MARCONI, E.; TRIVISONNO, M.C. Valorization of the Honeys from the Molise Region Through Physico-chemical, Organoleptic and Nutritional assessment. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p. 125-128, 1997.

ESTUPINÁN, S.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R.; GONZALEZ-CORTES Y.M.A. Parámetros de Calidad de la Miel. I. Microbiología, Caracteres Físico Químicos y de Envejecimiento. **Alimentaria**, v.296, p. 89-94, 1998.

ESTUPINÁN, S.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R.; CORTÉS, M.A.G. Evaluacion de la calidad sensorial de mieles artesanales de Gran Canaria. **Alimentaria**, p. 87-91, 1999.

FALLICO, B.; ZAPPALÀ, M.; ARENA, E.; VERZERA, A. Effects of Conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v.85, n.2, p. 305-313, 2004.

FARKAS, J. Irradiation as a Method for Decontaminating Food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 44, p. 189–204, 1998.

FARKAS, J.; POLYÁK-FEHÉR, K.; ANDRÁSSY, É.; MÉSZÁROS, L. Improvement of Microbiological Safety of Sous-vide Meals by Gamma Radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.63, p. 345-348, 2002.

FARKAS, J. Irradiation for Better Foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 148-152, 2006.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos – Princípios e prática**, 2ª edição, Editora Artmed, 2006, 602p.

FENICIA, L.; FERRINI, A.M.; AURELI, P.; POCECCO, M. A case of infant botulism associated with honey feeding in Italy. **European Journal of Epidemiology**, v.9, p. 671–673, 1993.

FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3<sup>th</sup>.edition, Marcel Dekker Inc., 1996, 1069p.

FERNÁNDEZ, R.O.; PIZARRO, R.A. Lethal Effect Induced in *Pseudomonas aeruginosa* Exposed to Ultraviolet-A Radiation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n.2, p. 334-339, 1996.

FINOLA, M.S.; LASAGNO, M.C.; MARIOLI, J.M. Microbiological and Chemical Characterization of Honeys from Central Argentina. **Food Chemistry**, v.100, p. 1649-1653, 2007.

FRANCIOSA, G.; AURELI, P.; SCHECHTER, R. *Clostridium botulinum*. In: **International Handbook of Foodborne Pathogens**. MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. Marcel Dekker Inc. New York, p. 72-101, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, 2005, 182p.

FRANÇOSO, I.L.T.; COUTO, M.A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Alterações Físico-químicas em Morangos (*Fragaria anassa Duch.*) Irradiados e Armazenados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.3, p. 614-619, 2008.

GHELARDI, E.; CELANDRONI, F.; SALVETTI, S.; BARSOTTI, C.; BAGGIANI, A.; SENESI, S. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. **FEMS Microbiology Letters**, v.208, n.1, p. 129-134, 2002.

GHELDOF, N.; WANG, X-H.; ENGESETH, N.J. Identification and Quantification of Antioxidant Components from Various Floral Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 5870-5877, 2002.

GILLARD, M.; CHARRIERE, J.D.; BELLOY, L. Distribution of *Paenibacillus larvae* spores inside honey bee colonies and its relevance for diagnosis. **Journal of Invertebrate Pathology** v.99, n.1, p.92-95, 2008.

GILLIAM, M.; LORENZ, B.J. ; RICHARDSON, G.V. Digestive enzymes and microorganisms in honey bees, *Apis mellifera*: influence of streptomycin, age, season and pollen. **Microbios**, v.55, p.95-114, 1988.

GONZALES, A.P.; BURIN, L.; DEL PILAR BUERA, M. Color Changes During Storage of Honeys in Relation to Their Composition and Initial Color. **Food Research International**, v.32,p. 185–191, 1999.

GONZALEZ-MIRET, M.L.; TERRAB, A.; HERNANZ, D.; FERNANDEZ-RECAMALES, M.A.; HEREDIA, F.J. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.7, p. 2574–2580, 2005.

GRECZ, N.; ROWLEY, D.B.; MATSUYAMA, A. *The effect of irradiation on bacteria and viruses*. IN: **Preservation of Food by Ionizing Radiation**, JOSEPHSON , E.S.; PETERSON, M.S. eds. CRC Press: Boca Raton, FL, 1983.

GROSSO, G.S. **Cr terios Relativos al An lisis Sensorial de Mieles**. 2006. Dispon vel em: <[http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/65\\_analisis\\_sensorial\\_mieles.doc](http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/65_analisis_sensorial_mieles.doc)>. Acesso em: 29 ago. 2009.

GUNES, G.; TEKIN, M.D. Consumer awareness and acceptance of irradiated foods: results of a Surrey conducted on Turkish consumers. **LWT – Food Science and Technology**, v.39, n.4, p. 444-448, 2006.

HANES, D. *Nontyphoid salmonella*. In: **International Handbook of Foodborne Pathogens**. MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. Marcel Dekker Inc. New York, p. 72-101, 2003.

HAU, L-B.; LIEW, M-S. Effect of Gamma-Irradiation and Cooking on Vitamin B<sub>6</sub> and B<sub>12</sub> in Grass Prawns (*Penaeus monodon*). **Radiation Physics and Chemistry**, v.42, n.1-3, p. 297-300, 1993.

HERNANDES, N.K.; VITAL, H.C.; SABAA-SRUR, A.U.O. Irradia o de alimentos: vantagens e limita es. **Bol.SBCTA**,Campinas, v.37, n.2, p. 154-159, 2003.

HONG, S.I.; KIM, J.Y.; CHO, S.Y.; PARK, H.J. The Effect of Gamma Irradiation on Oleic Acid in Methyl Oleate and Food. **Food Chemistry**, v. 121, p. 93-97, 2010.

HOSNY, I.M.; EL-GHANI, S.A.; NADIR, A.S. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Three Unifloral Honeys with Emphasis on Processing of Honey Probiotic Yoghurt. **Global Veterinaria**, v.3, n.2, p. 107-112, 2009.

HUSOY, T.; HAUGEN, M.; MURKOVIC, M.; JOBSTL, D.; STOLEN, L.H.; BJELLAAS, T.; RONNINGBORG, C.; GLATT, H.; ALEXANDER, J. Dietary exposure to 5-hydroxymethylfurfural from Norwegian food and correlations with urine metabolites of short-term exposure. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 3697-3702, 2009.

IARIA, S.T.; FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Revista Saúde Pública**, v.14, p. 93-100, 1980.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Planilha de Importações-Exportações**. 2005a. Disponível em: <<http://www.apis.sebrae.com.br>>. Acesso em: 11 jun. 2009.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Planilha de Produção de Mel 2001 a 2005** .2005b. Disponível em: <<http://www.apis.sebrae.com.br>>. Acesso em: 11 jun. 2009.

ICGFI. INTERNATIONAL CONSULTATIVE GROUP ON FOOD IRRADIATION. **Facts About Food Irradiation**.1999. Disponível em: <<http://www.iaea.org>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

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

IURLINA, M.O.; FRITZ, R. Characterization of Microorganisms in Argentinean Honeys from Different Sources. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, p. 297-304, 2005.

IURLINA, M.O.; SAIZ, A.I.; FUSELLI, S.R.; FRITZ, R. Prevalence of *Bacillus* spp. In different food products collected in Argentina. **LWT – Food Science and Technology**, v.39, n.2, p. 105-110, 2006.

IURLINA, M.O.; SAIZ, A.I.; FRITZ, R.; MANRIQUE, G.D. Major Flavonoids of Argentinean Honeys. Optimisation of the Extraction Method and Analysis of Their Content in Relationship to the Geographical Source of Honeys. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1141-1149, 2009.

IWERSEN, A.T.; YAMANAKA, E.H.U.; JÚNIOR, L.F.L.L.; MONTEIRO, C.L.B.; COGO, L.L.; BEUX, M.R. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais envasadas – Dinâmica populacional de *Pseudomonas aeruginosa*. **B.CEPPA**, Curitiba, v.27, n.2, p. 207-212, 2009.

JAGDISH, T.; JOSEPH, I. Quantification of saccharides in multiple floral honeys using fourier transform infrared microattenuated total reflectance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 3237-3243, 2004.

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

JIANG, T.; LUO, S.; CHEN, Q.; SHEN, L.; YING, T. Effect of Integrated Application of Gamma Irradiation and Modified Atmosphere Packaging on Physicochemical and Microbiological Properties of Shiitake Mushroom (*Lentinus edodes*). **Food Chemistry**, v. 122, p. 751-757, 2010.

JIMÉNEZ, M.; MATEO, J.J.; HUERTA, T.; MATEO, R. Influence of the Storage Conditions on Some Physicochemical and Mycological Parameters of Honey. **J. Sci. Food Agric.**, v.64, p. 64-74, 1994.

JO, C.; KIM, J.K.; KANG, J.; LEE, E.Y.; BYUN, M.W. **Irradiation Effects on the Decontamination of Microorganisms in Honey**. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM NEW FRONTIER OF IRRADIATED FOOD AND NON-FOOD PRODUCTS. Bangkok, Thailand, 22/09/2005.

JOSEPHSON, E.S.; PETERSON, M.S. **Preservation of Food by Ionizing Radiation**, Vol. II, CRC Press, Boca Raton, 1983.

KAYSER, F.H.; BIENZ, K.A.; ECKERT, J.; ZINKERNAGEL, R.M. **Medical Microbiology**, 1ª edição, Thieme, 2005, 724 p.

KILCAST, D. Food Irradiation: Current Problems and Future Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 279-296, 1995.

KISHORE, K.M.; MOORTHY, P.N.; RAO, K.N. Radiation protection of vitamins in aqueous systems. Part III. Effects of different variables. **Radiation Effects**, v.38, p. 97-105, 1978.

KIM, K-H.; YOON, H-S. Effect of Gamma Irradiation on Quality of Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 414-421, 2009).

KISHORE, K.M.; MOORTHY, P.N.; RAO, K.N. Role of hydrogen peroxide in the radiolysis of B-group vitamins in neutral aqueous solutions. Part I. Reactions with vitamin radicals produced by hydroxyl radical reactions. **Radiation Effects Letters**, v.67, p. 153-159, 1982.

KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C. Análises Físico-Químicas de Amostras de Méis de Flores Silvestres, de Eucalipto e de Laranjeira, Produzidos por *Apis Mellifera L.*, 1758 (*Hymenoptera, Apidae*) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de Açúcares e de Proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.2, p. 143-146, 2002.

KUME, T.; FURUTA, M.; TODORIKI, S.; UENOYAMA, N.; KOBAYASHI, Y. Status of food irradiation in the world. **Radiation Physics and Chemistry**, v.78, p. 222-226, 2009.

LA GRANGE, V.; SANDERS, S.W. Honey in Cereal-Based New Food Products. **American Association of Cereal Chemists**, v.33, n.10, p. 833- 838, 1988.

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 Chemistry**, v. 101, p. 973-979, 2007.

LACROIX, M.L.; CHARBONNEAU, R.; JOBIN, M.; THIBAUT, C.; NOUCHPRAMOOL, K.; CHAROEN, S.; GAGNON, M. A Feasibility Study of Gamma Irradiation on Thailand Frozen Shrimps (*Peneus monodon*). **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, n.4-6, p. 739-744, 1995.

LAGUNAS-SOLAR, M.C. Radiation processing of foods: an overview of scientific principles and current status. **Journal of Food Protection**, v.58, n.2, p. 186-192, 1995.

LEGNANI, P.; LEONI, E.; RAPUANO, S.; TURIN, D.; VALENTI, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5-year study. **International Journal of Food Microbiology**, v.53, p. 153-158, 1999.

LIANG, Y.; CAO, W.; CHEN, W-J.; XIAO, X-H.; ZHENG, J-B. Simultaneous Determination of Four Phenolic Components in Citrus Honey by High Performance Liquid Chromatography Using Electrochemical Detection. **Food Chemistry**, v.114, p. 1537-1541, 2009.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: **Microbiologia** TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 359-375, 2004.

LOPÉZ, A.C.; ALIPPI, A.M. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 175-184, 2007.

LUCHT, L.; BLANK, G.; BORSA, J. Recovery of Food-borne Microorganisms from Potentially Lethal Radiation Damage. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 586–590, 1998.

LUKTON, A.; MACKINNEY, G. Effect of Ionizing Radiations on Carotenoid Stability. **Food Technology**, v.10, p. 630-632, 1956.

MACEDO, L.N.; LUCHIESE, R.H.; GUERRA, A.F.; BARBOSA, C.G. Efeito Prébiótico do Mel sobre o Crescimento e Viabilidade de *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* em Leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.4, p. 935-942, 2008.

MAIA, A.A.; CANTISANI, M.L.; ESPOSTO, E.M.; SILVA, W.C.P.; RODRIGUES, E.C.P.; RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p. 114-119, 2009.

MANZANARES, A.B. Aportaciones Metodológicas al Análisis Sensorial Descriptivo de las mieles. Descripción de olores y aromas. **Alimentaria**, n. 335, p. 49-52, 2002.

MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C.; OTSUK, I.P. Análise de Agrupamento, com Base na Composição Físico-química, de Amostras de Méis Produzidos por *Apis mellifera L.* no Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.1, p. 8-17, 2005.

MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L.; BERNARDO, F.M.A. Esporos de *Bacillaceae*, fungos e aflatoxinas em mel. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n.546, p. 85-88, 2003.

MASSON, B. **O Mel: o delicioso sabor de um alimento nutritivo**. São Paulo SP: Editora Gaia, 1994, 117p.

MATSUDA, A.H.; SABATO, S.F. Effects of Irradiation on Brazilian Honeys' Consistency and Their Acceptability. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, n.1-2, p. 109-112, 2004.

MCKIBBEN, J.; ENGESETH, N.J. Honey as a Protective Agent Against Lipid Oxidation in Ground Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 592-595, 2002.

MERCOSUL. MERCADO COMUM DO SUL. Resolução GMC Nº 80/96. **Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos elaboradores/industrializados de alimentos**, 1996.XXIII GMC, Brasília: 11/10/96.

MERCOSUL. MERCADO COMUM DO SUL. Resolução GMC Nº 36/93. **Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados**. Brasília:1993.

MIGDAL, W.; OWEZARCZYK, H.B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA-KEDZIA, E.; MADAJEZYK, D. Microbiological decontamination of natural honey by irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.57, p. 285-288, 2000.

MISHRA, B.B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Shelf Life Extension of Fresh Ginger (*Zingiber officinale*) by Gamma Irradiation. **Journal of Food Science**, v.69, n. 9, p. 274–279, 2004.

MIYAHARA, M.; SAITO, A.; KAMIMURA, T.; NAGASAWA, T.; ITO, H.; TOYODA, M. Hydrocarbon Productions in Hexane Solutions of Fatty Acid Methyl esters Irradiated with Gamma Rays. **Journal of Health Science**, v.48, n.5, p. 418–426, 2002.

MOLAN, P. The Antimicrobial Activity of Honey. **Bee World**, v.73, p. 5–28, 1992.

MOLINS, R.A. **Food irradiation: Principles and applications**. John Wiley & Sons Inc., 2001, 469p.

MONIEN, B.H.; FRANK, H.; SEIDEL, A.; GLATT, H. Conversion of the common food constituent 5-hydroxymethylfurfural into a mutagenic and carcinogenic sulfuric acid ester in the mouse in vivo. **Chemical Research Toxicology**, v.22, p. 1123-1128, 2009.

MONTILLA, A.; RUIZ-MATUTE, A.I.; SANZ, M.L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; DEL CASTILLO, M.D. Difructose Anhydrides as Quality Markers of Honey and Coffee. **Food Research International**, v.39, p. 801-806, 2006.

MORALES, V.; CORZO, N.; SANZ, M.L. HPAEC-PAD Oligosaccharide Analysis to Detect Adulterations of Honey with Sugar Syrups. **Food Chemistry**, v.107, p. 922-928, 2008.

MOREHOUSE, K.M.; KU, Y. Identification of Irradiated Foods by Monitoring Radiolytically produced Hydrocarbons. **Radiation Physics and Chemistry**, v.42, n.1-3, p. 359-362, 1993,

MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B. Glicídios no mel. **Química Nova**, v.24, n.4, p. 516-525, 2001.

MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B.; PIETROLUONGO, M.; TRUGO, L.C. Chemical Changes in the Non-volatile Fraction of Brazilian Honeys During Storage Under Tropical Conditions. **Food Chemistry**, v.104, p. 1236-1241, 2007.

MOY, J.H. Efficacy of Irradiation vs Thermal Methods as Quarantine Treatments for Tropical Fruits. **Radiation Physics and Chemistry**, v.42, n.1-3, p. 269-272, 1993.

MOY, J.H.; WONG, L. The Efficacy and Progress in Using Radiation as a Quarantine Treatment of Tropical Fruits – a case study in Hawaii. **Radiation Physics and Chemistry**, v.63, p. 397-401, 2002.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Growth Inhibition of Foodborne Pathogens and Food Spoilage Organisms by Select Raw Honeys. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p. 1-8, 2004.

NANDA, V.; SARKAR, B.C.; SHARMA, H.K.; BAWA, A.S. Physico-chemical Properties and Estimation of Mineral Content in Honey Produced from Different Plants in Northern India. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.16, p. 613-619, 2003.

NAWAR, W.W. Volatiles from food irradiation. **Food Review International**, v.2, n.1, p. 45-78, 1986.

NETO, A.C.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, n.3, p. 263-271, 2002.

NEVAS, M.; HIELM, S.; LINDOSTROM, M.; HORN, H.; KOIVULEHTO, K.; KORKEALA, H. High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p. 45-52, 2002.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L.; JIMÉNEZ, J.J.; MARTÍN, M.T. High-performance liquid chromatographic determination of metil anthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in Honey. **Journal of Chromatography A**, v.917, n.1-2, p. 95-103, 2001.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2ª edição, Atheneu Editora São Paulo, 2003, 474 p.

OH, S-H.; LEE, Y-S.; LEE, J-W; KIM, M.R.; YOOK, H-S.; BYUN, M-W. The Effect of Gamma-Irradiation on the Non-Enzymatic Browning Reaction in the Aqueous Model Solutions. **Food Chemistry**, v. 92, p. 357-363, 2005.

OJEDA DE RODRÍGUEZ, G.; SULBARÁN DE FERRER, B.; FERRER, A.; RODRÍGUEZ, B. Characterization of Honey Produced in Venezuela. **Food Chemistry**, v.84, n.4, p. 499-502, 2004.

OLAITAN, P.B.; ADELEKE, O.E.; OLA, I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, v.7, n.3, p. 159-165, 2007.

OLSON, D.G. Irradiation of Food. **Food Technology**, v.52, n.1, p. 56-62, 1998.

ORNELLAS, C.B.D.; GONÇALVES, M.P.J.; SILVA, P.R.; MARTINS, R.T. Atitude do consumidor frente à irradiação de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p. 211-213, 2006.

PACHECO, M.R. **Cria Ensacada Brasileira em *Apis mellifera Linnaeus* no Estado do Rio de Janeiro: perdas, zoneamento, palinologia e microbiologia**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, 2006.

PAN, J.; VICENTE, A.R.; MARTÍNEZ, G.A.; CHAVES, A.R.; CIVELLO, P.M. Combined Use of UV-C Irradiation and Heat Treatment to Improve Postharvest Life of Strawberry Fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1831-1838, 2004.

PELLEGRINO, F.L.P.C.; TEIXEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G.S.; NOUÉR, S.A.; OLIVEIRA, M.P.; SAMPAIO, J.L.M.; FREITAS, A.D.; FERREIRA, A.L.P.; AMORIM, E.L.T.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p. 2420-2424, 2002.

PELISSER, M.R.; KLEIN, C.S.; ASCOLI, K.R.; ZOTTI, T.R.; ARISI, A.C.M. Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p. 145-148, 2009.

PERCHONOK, M.; BOURLAND, C. NASA Food Systems: past, present and future. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 913-920, 2002.

PERSANO ODDO, L.; PIAZZA, M.G.; SABATINI, A.G.; ACCORTI, M. Characterization of unifloral honeys. **Apidologie**, v.26, p. 453-465, 1995.

PERSANO ODDO, L.; PIAZZA, M.G.; PULCINI, P. Invertase Activity in Honey. **Apidologie**, v.30, n.1, p. 57-65, 1999.

PERSANO ODDO, L.; PIRO, R. Main European Unifloral Honeys: descriptive sheets. **Apidologie**, v.35, Suppl.1, S38-S81, 2004.

PETERSON, D.L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species – review. **Clinical Infectious Diseases**, suppl.2, p. S43-48, 2006.

PIANA, M.L.; PERSANO ODDO, L.; BENTABOL, A.; BRUNEAU, E.; BOGDANOV, S.; DECLERCK, C.G. Sensory Analysis Applied to Honey: state of the art. **Apidologie**, v.35, p. S26-S37, 2004.

POLOVKA, M.; SUHAJ, M. Detection of Caraway and Bay Leaves Irradiation Based on Their Extracts Antioxidant Properties Evaluation. **Food Chemistry**, v.119, p. 391-401, 2010.

PONIKVAR, M.; SNAJDER, J.; SEDEJ, B. Honey as a Bioindicator for Environmental Pollution with SO<sub>2</sub>. **Apidologie**, v.36, p. 403-409, 2005.

PRAKASH, A.; GUNER, A.; CAPORASO, F.; FOLEY, D. Effects of Low-Dose Gamma Irradiation on the Shelf Life and Quality Characteristics of Cut Romaine Lettuce Packaged Under Modified Atmosphere. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p. 549–553, 2000a.

PRAKASH, A.; INTHAJAK, P.; HUIBREGTSE, H.; CAPORASO, F.; FOLEY, D. Effects of Low-Dose Gamma Irradiation and Conventional Treatments on Shelf Life and Quality Characteristics of Diced Celery. **Journal of Food Science**, v.65, n.6, p. 1070–1075, 2000b.

PRYKE, D.C.; TAYLOR, R.R. The Use of Irradiated Food for Immunosuppressed Hospital Patients in the United Kingdom. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 8, n.6, p. 411-416, 2008.

RADDI, M.S.G.; LEITE, C.Q.; MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, v.22, n.1, p. 36-40, 1988.

RAJKOWSKI, K.T.; BENNETT, R.W. *Bacillus cereus*. In: **International Handbook of Foodborne Pathogens**. MILIOTIS, M.D. ; BIER, J.W. Marcel Dekker Inc. New York, p. 40-52, 2003.

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

REIBNITZ, M.G.R.; TAVARES, L.B.B.; GARCÍA, J.A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAsa positivos en queso. **Revista Argentina de Microbiología**, v.30, n.1, p.8-12, 1998.

RESURRECCION, A.V.A.; GALVEZ, F.C.F.; FLETCHER, S.M.; MISRA, S.K. Consumers attitudes towards irradiated food: results of a new study. **Journal of Food Protection**, v.58, n.2, p. 193-196, 1995.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; AMARAL, L.A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p. 1563-1569, 2007.

ROCHA, H.C.; BAGAGLI, E.; FUNARI, S. R. C. Identificação do fungo *Ascosphaera apis* em colméias de abelhas *Apis mellifera* L. no Estado de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12º, 1998, Salvador, **Anais...** Salvador: CBA, p.247-248, 1998.

RODRIGUES, K.L.; MOREIRA, A.N.; ALMEIDA, A.T.S.; CHIOCHETTA, D.; RODRIGUES, M.J.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 297-299, 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 Carbono. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.2, p. 199-204, 1999.

SABATO, S.F. Rheology of Irradiated Honey From Parana Region. **Radiation Physics and Chemistry**, v.71, n. 1-2, p. 101-104, 2004.

SABATO, S.F.; SILVA, J.M.; CRUZ, J.N.; BROISLER, P.O.; RELA, P.R.; SALMIERI, S.; LACROIX, M. Advances in Commercial Application of Gamma Radiation in Tropical Fruits at Brazil. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 655-658, 2009.

SABIONI, J.G.; HIROOKA, E.Y.; DE SOUZA, M.L. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado por *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde Pública**, v.22, n.5, p. 458-461, 1988.

SALIMOV, R.A.; CHEREPKOV, V.G.; KUKSANOV, N.K.; KUZNETZOV, S.A. The Use of Electron Accelerators for Radiation Disinfestation of Grain. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 57, p. 625-627, 2000.

SANT'ANA, A.S.; SILVA, S.C.F.L.; FARANI JÚNIOR, I.O.; AMARAL, C.H.R.; MACEDO, V.F. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, Supl., p. 190-194, 2003.

SANT'ANA, A.S.; AZEREDO, D.R.P. Comparação entre o sistema PETRIFILM RSA® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.3, p. 531-535, 2005.

SANTOS, B.M.O.; AGUILLAR, O.M.; TAKAKURA, M.S. Colonização simultânea de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal e mãos de portadores sãos de um hospital escola. **Revista Microbiologia**, v.21, n.4, p. 309-314, 1990.

SANTOS, B.M.O. Monitoramento da colonização pelo *Staphylococcus aureus* em alunos de um curso de auxiliar de enfermagem durante a formação profissional. **Revista Latino Americana de enfermagem**, v.8, n.1, p. 67-73, 2000.

SATIN, M. **La irradiación de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1997. 175 p.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Microbial Decontamination of Honey of Indian Origin Using Gamma Irradiation and its Biochemical and Organoleptic Properties. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, p. M19-M27, 2010.

SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Exportações de Mel Batem Recorde em Março**. 2009a.

Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 13 de jul. 2009.

SEBRAE. SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO AS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Mercado e Histórico da Apicultura no Brasil**. 2009b.

Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 14 de jul. 2009.

SENDRA, E; CAPELLAS, M.; GUAMIS, B.; FELIPE, X.; MOR-MUR, M.; PLA, R. Irradiación de alimentos – Aspectos Generales. **Food Science and Technology International**, v.2, p. 1-11, 1996.

SILVA, W.P.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M. Biochemical characteristics of typical and atypical *Staphylococcus aureus* in mastitic milk and environmental samples of Brazilian dairy farms. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p. 103-106, 2000.

SILVA, R.N.; MONTEIRO, V.N.; ALCANFOR, J.D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI, E.R. Comparação de Métodos para a Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Mel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p. 337-341, 2003a.

SILVA, W.P.; SILVA, J.A.; MACEDO, M.R.P.; ARAÚJO, M.R.; MATA, M.M.; GANDRA, E.A. Identification of *Staphylococcus aureus*, *S.intermedius* and *S.hyicus* by PCR amplification of *coa* and *nuc* genes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 125-127, 2003b.

SILVA, S.J.N.; SCHUCH, P.Z.; VAINSTEIN, M.H.; JABLONSKI, A. Determinação do 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, Supl., p.46-50, 2008.

SILVA JUNIOR, E.A.E. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 2ª ed. São Paulo: Varela,1996, 329p.

SIMIC, M.G. *Radiation Chemistry of water-soluble food components*. IN: **Preservation of Food by Ionizing Radiation**, JOSEPHSON, E.S.; PETERSON, M.S. CRC Press, Boca Raton,v.2, p. 1-73, 1983.

SINGH, S.P.; PAL, R.K. Ionizing Radiation Treatment to Improve Postharvest Life and Maintain Quality of Fresh Guava Fruit. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 135-140, 2009.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Classification of Simple and Complex Sugar Adulterants in Honey by Mid-Infrared Spectroscopy. **International Journal of Food Science & Technology**, v.37, n.4, p. 351-360, 2002.

SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in Honey. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, p. 1-26, 1996.

SODRÉ, G.S. ; MARCHINI, L.C. ; MORETI, A.C. ; CARVALHO, C.A.L. Análises Multivariadas com Base nas Características Físico-Químicas de Amostras de Méis de *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) da Região Litoral Norte no Estado da Bahia. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v.11, n.3, p. 129-137, 2003.

SODRÉ, G.S.; CARVALHO, C.A.L.; FONSECA, A.A.O.; ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A. Perfil Sensorial e Aceitabilidade de Méis de Abelhas Sem Ferrão Submetidos a Processos de Conservação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, Supl., p. 72-77, 2008.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7ª edição, Editora LTC, v.1, 2001, 645p.

SOUZA, M.C.L.; JESUS, E.F.O.; LOPES, R.T.; LEMOS, C.S.; BORGES, V.B.; ASSIS, J.T.; VITAL, H.C.; VILA, A.J.M.; GOMES, S.R. Caracterização físico-química e sensorial de mel de abelhas de floradas silvestres irradiado. **Higiene Alimentar**, v.22, n.160, p. 89-92, 2008.

SPANO, N.; CIULU, M.; FLORIS, I.; PANZANELLI, A.; PILO, M.I.; PIU, P.C.; SALIS, S.; SANNA, G. A Direct RP-HPLC Method for the Determination of Furanic Aldehyde and Acids in Honey. **Talanta**, v.78, p. 310-314, 2009.

SPOTO, M.H.F.; GALLO, C.R.; ALCARDE, A.R.; GURGEL, M.S.A.; BLUMER, L.; WALDER, J.M.M.; DOMARCO, R.E. Gamma Irradiation in the Control of Pathogenic Bacteria in Refrigerated Ground Chicken Meat. **Scientia Agrícola**, v. 57, n. 3, p. 389-394, 2000.

STEVENSON, M.H. Nutritional and Other Implications of Irradiated Meat. **The proceedings of the Nutrition Society**, v.53, p. 317-325, 1994.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. 3ª edição, Academic Press, 2004, ISBN 0-12-672690-6, 408 p.

STRYDOM, G.J.; WHITEHEAD, C.S. The Effect of Ionizing Radiation on Ethylene Sensitivity and Postharvest Ripening of Banana Fruit. **Scientia Horticulturae**, v.41, n.4, p. 293-304, 1990.

SWALLOW, K.W.; LOW, N.H. Determination of honey authenticity by anion exchange chromatography. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, v.77, p. 695-702, 1994.

TAKAHASHI, M.; SHIMIZU, T.; OOI, K.; NODA, H.; NASU, T.; SAKAGUCHI, G. Quantification of *Clostridium botulinum* type A toxin and organisms in the feces of a case of infant botulism and examination of other related specimens. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v.41, p. 21-26, 1988.

TAORMINA, P.J.; NIEMIRA, B.A.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v.69, p. 217–225, 2001.

TEIXIDÓ, E.; SANTOS, F.J.; PUIGNOU, L.; GALCERAN, M.T. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography- mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1135, n.1, p. 85-90, 2006.

TERRAB, A.; RECAMALES, A.F.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J. Characterization of Spanish Thyme Honeys by Their Physicochemical Characteristics and Mineral Contents. **Food Chemistry**, v.88, n.4, p.537-542, 2004.

THAYER, D.W. Food Irradiation: benefits and concerns. **Journal of Food Quality**, v.13, p. 147–169, 1990.

THE NATIONAL HONEY BOARD. **Honey and Antioxidants**. 2003. Disponível em: <<http://www.honey.com/consumers/honeyhealth/nutritionresearch/antioxidants.asp>>. Acesso em: 21 set. 2009.

THOMAS, P.; DHARKAR, S.D.; SREENIVASAN, A. Effect of Gamma Irradiation on the Postharvest Physiology of Five Banana Varieties Grown in Índia. **Journal of Food Science**, v.36, n.2, p. 243-247, 2006.

TOBBACK, P.P. Radiation chemistry of vitamins. IN: **Radiation Chemistry of Major Food Components**, ELIAS, P.S.; COHEN, A.J., Elsevier Scientific, Amsterdam, p. 63-187-220, 1977.

TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RÉ, E.; LUCERO, H. Honey Thermal Treatment Effects on Hydroxymethylfurfural Content. **Food Chemistry**, v.77, n.1, p. 71-74, 2002.

TOSI, E.; MARTINET, R.; ORTEGA, M.; LUCERO, H.; RÉ, E. Honey Diastase Activity Modified by Heating. **Food Chemistry**, v.106, p. 883-887, 2008.

TOVEY, F.I. Honey and Healing. **Journal of Royal Society of Medicine**, v.84, n.7, p. 447, 1991.

TUKENMEZ, I.; ERSEN, M.S.; BAKIOGLU, A.T.; BIÇER, A.; PAMUK, V. Dose Dependent Oxidation Kinetics of Lipids in Fish During Irradiation Processing. **Radiation Physics and Chemistry**, v.50, n.4, p. 407-414, 1997.

TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; TAVUKCOUGLU, H.R. Quality of Honeys Influenced by Thermal Treatment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1396-1399, 2007.

TYSSET, C.; DE RAUTLIN, Y.; DE LA ROY. Assays on the study of ‘osmophilic’ yeasts, organisms causing fermentations of honey collected in France. **Ass. Diplom. Microbiol. Fac. Pharm. Univ. Nancy Bull**, v.134, p. 1–26, 1974.

URBAIN, W.M. *Biological effects of ionizing radiation*. In: **Food Irradiation**. Food science & technological series. London: Academic Press, p. 83-117, 1986.

WELKE, J.E.; REGINATTO, S.; FERREIRA, D.; VICENZI, R.; SOARES, J.M. Caracterização Físico-Química de Méis de *Apis mellifera L.* da Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.38, n.6, p. 1737-1741, 2008.

WESTON, R.J. The contribution of Catalase and Other Natural Products to the Antibacterial Activity of Honey: a review. **Food Chemistry**, v.71, p. 235-239, 2000.

WIESE, H. **Nova Apicultura**, Guaíba RS: Agropecuária, 1993, 493p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Present State of Foodborne Disease in OECD Countries**, 2003. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 23 set. 2009.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food Safety and Foodborne Illness**. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 23 set. 2009.

YOKOYA, A.; SHIKAZONO, N.; FUJII, K.; URUSHIBARA, A.; AKAMATSU, K.; WATANABE, R. DNA Damage Induced by the Direct Effect of Radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, n. 10-12, p. 1280-1285, 2008.

ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J.; ROLDÁN, D. On the Nature of the Relationship Between Water Activity and % Moisture in Honey. **Food Control**, v.17, n.8, p. 642-647, 2006.

ZHANG, L.; ZHAOXIN, L.; FENGXIA, L.; XIAOMEI, B. Effect of Gamma Irradiation on Quality Maintaining of Fresh Cut Lettuce. **Food Control**, v. 17, p. 225–228, 2006.

**Endereços eletrônicos consultados:**

<[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 28 de set. 2009.

<[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 27 de set. 2009.

<[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/37\\_280708.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/37_280708.htm)>. Acesso em: 04 mai. 2010.

<[http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/abril07/Planilha\\_Imp\\_Exp\\_Abril.pdf](http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/abril07/Planilha_Imp_Exp_Abril.pdf)>. Acesso em: 11 jun. 2009.

<[http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA%20Cong\\_Bras\\_Apic/Anais\\_3/AN%C3%81LISE%20SENSORIAL%20DO%20MEL%20PROVENIENTE%20DA%20FLORADA%20DO%20CAJUEIRO.pdf](http://www.apis.sebrae.com.br/Arquivos/16%C2%BA%20Cong_Bras_Apic/Anais_3/AN%C3%81LISE%20SENSORIAL%20DO%20MEL%20PROVENIENTE%20DA%20FLORADA%20DO%20CAJUEIRO.pdf)> . Acesso em: 10 ago. 2009.

<<http://ccr.ucdavis.edu/irr/history.shtml>>. Acesso em: 25 set. 2009.

<<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5553a1.htm>>. Acesso em: 23 ago. 2009.

<<http://www.cena.usp.br/irradiacao/equipamentos.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2009.

<<http://www.cena.usp.br/irradiacao/principios.htm>>. Acesso em: 27 jun. 2009.

<[http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad\\_ion.pdf](http://www.cnen.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2009.

<<http://www.colmeias.com.br/index.php?src=colmeias/produtos>>. Acesso em: 14 mar. 2009.

<[http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/65\\_analisis\\_sensorial\\_mieles.doc](http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/miel/65_analisis_sensorial_mieles.doc)>. Acesso em: 29 ago. 2009.

<[http://en.wikipedia.org/wiki/Bee\\_keeping](http://en.wikipedia.org/wiki/Bee_keeping)>. Acesso em: 13 mar. 2009.

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070492.htm>> . Acesso em: 02 out. 2009.

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070000.htm>> . Acesso em: 02 out. 2009.

<<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070015.htm>>. Acesso em: 02 out. 2009.

<<http://www.honey.com/consumers/honeyhealth/nutritionresearch/antioxidants.asp>> Acesso em: 21 set. 2009.

<<http://www.iaea.org/nafa/d5/public/foodirradiation.pdf>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

<[portal.saude.gov.br](http://portal.saude.gov.br)>. Acesso em: 04 mai. 2010.

<<http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobreapicultura/mercado/exportacoes>>. Acesso em: 13 de jul. 2009.

<<http://uw-food-irradiation.engr.wisc.edu/images/radura.gif>>. Acesso em 23 mar. 2009.

<[http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/en/OECD%20Final%20for%20WEB.pdf](http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/foodborne_disease/en/OECD%20Final%20for%20WEB.pdf)>. Acesso em: 23 set. 2009.

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 23 set. 2009.

## APÊNDICES:

**APÊNDICE A** – Ficha empregada no teste de diferença em relação ao controle (teste triangular).

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Sexo: ( ) Fem ( ) Masc

Gosta de mel: ( ) sim ( ) não

Você está recebendo 3 amostras de "Mel de \_\_\_\_\_" codificadas.  
Identifique na barra a intensidade da diferença em relação ao padrão (P).

### **Amostra 237**

0	1	2	3	4	5	6
Idêntico ao Padrão			muito diferente do Padrão			

### **Amostra 468**

0	1	2	3	4	5	6
Idêntico ao Padrão			muito diferente do Padrão			

### **Amostra 572**

0	1	2	3	4	5	6
Idêntico ao Padrão			muito diferente do Padrão			

**APÊNDICE B** – Ficha empregada na avaliação do perfil do consumidor e teste de preferência.

Data: 22/10/2009

Idade:                      Sexo: ( ) feminino      ( ) masculino

Por favor, prove da esquerda para a direita as amostras codificadas de mel de \_\_\_\_\_ e marque a amostra que você prefere.

273

952

Comentários:

Com que frequência consome mel?

- ( ) diariamente  
 ( ) 2 a 3 vezes por semana  
 ( ) 1 vez por semana  
 ( ) 1 vez a cada 15 dias  
 ( ) 1 vez por mês  
 ( ) esporadicamente  
 ( ) raramente  
 ( ) outros \_\_\_\_\_

Onde vc consome mel?

- ( ) casa  
 ( ) trabalho/universidade  
 ( ) viagem/ hotel  
 ( ) lanchonete  
 ( ) restaurante  
 ( ) outros \_\_\_\_\_

Em que momento do dia consome mel?

- ( ) jejum  
 ( ) café da manhã  
 ( ) lanche  
 ( ) almoço  
 ( ) jantar  
 ( ) antes de dormir

Condição de consumo:

- ( ) puro (colher ou sachet)  
 ( ) em sucos ou com frutas  
 ( ) com cereais matinais ou granola  
 ( ) em iogurtes  
 ( ) sobremesas e confeitos  
 ( ) na forma de medicamento (pastilha,spray,xaropes e compostos de mel)  
 ( ) outros \_\_\_\_\_

Qual o motivo de consumir mel?

- ( ) saúde  
 ( ) paladar  
 ( ) auxílio no tratamento de saúde (gripes, resfriados, dor de garganta...)  
 ( ) outros \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C** - Tabela de ANOVA gerada para análise dos resultados para o teste de diferença em relação ao controle para as amostras de méis monoflorais de eucalipto.

Mel Eucalipto				
ANOVA				
P value	0,0314			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	3,798			
R squared	0,1666			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	24,1	2	12,05	
Individual (between rows)	99,33	19	5,228	
Residual (random)	120,6	38	3,173	
Total	244	59		
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Padrão VS Amostra 5KGy	-0,7	1,243	P > 0.05	-1.993 to 0.5933
Padrão VS Amostra 10KGy	-1,55	2,752	P < 0.05	-2.843 to -0.2567

**APÊNDICE D** - Tabela de ANOVA gerada para análise dos resultados para o teste de diferença em relação ao controle para as amostras de méis monoflorais de laranjeira.

Mel Laranjeira				
ANOVA				
P value	0,9346			
P value summary	ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	3			
F	0,06773			
R squared	0,003552			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,4333	2	0,2167	
Individual (between rows)	54,93	19	2,891	
Residual (random)	121,6	38	3,199	
Total	176,9	59		
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Padrão vs Amostra 5KGy	-0,05	0,0884	P > 0.05	-1.349 to 1.249
Padrão vs Amostra 10KGy	0,15	0,2652	P > 0.05	-1.149 to 1.449

**APÊNDICE E** - Tabela de ANOVA gerada para análise dos resultados para o teste de diferença em relação ao controle para as amostras de méis poliflorais silvestres.

Mel Silvestre				
ANOVA				
P value	0,0452			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	3,363			
R squared	0,1504			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	12,63	2	6,317	
Individual (between rows)	112,2	19	5,904	
Residual (random)	71,37	38	1,878	
Total	196,2	59		
Dunnett's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
Padrão vs Amostra 5KGy	-0,75	1,731	P > 0.05	-1.745 to 0.2450
Padrão vs Amostra 10KGy	-1,1	2,538	P < 0.05	-2.095 to -0.1050

## ANEXOS:

### ANEXO A - Fatores que contribuem para a natureza antimicrobiana do mel.

<b>Fatores:</b>
Alta pressão osmótica - baixa atividade de água.
Baixo pH – meio ácido
Sistema glicose oxidase
Baixo conteúdo protéico
Alta proporção carbono: nitrogênio
Baixo potencial redox
Alta viscosidade
Pinocembrina
Ácidos fenólicos
Terpenos
Álcool benzílico

**FONTE:** Snowdon e Cliver (1996)

### ANEXO B - Valores de atividade de água mínima para multiplicação de microrganismos contaminantes em méis.

<b>Organismos</b>	<b>Aa</b>
Bactérias deteriorantes	0,9
Leveduras deteriorantes	0,88
Bolores deteriorantes	0,80
Bactérias halofílicas	0,75
Bolores xerofílicos	0,65
Leveduras osmofílicas	0,61
<i>Bacillus cereus</i>	0,95
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A/B	0,94
<i>Pseudomonas spp.</i>	0,97
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
<i>Salmonella spp.</i>	0,94

**FONTE:** Franco e Landgraf (2005).

**ANEXO C** - Valores de pH para multiplicação de bactérias contaminantes em méis.

Bactérias	Valores de pH	
	Mínimo-máximo	Ótimo
<i>Bacillus cereus</i>	4,9-9,3	-
<i>Clostridium botulinum</i>	4,8-8,8	6,0-8,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6-9,0	6,6-7,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0-9,8	6,0-7,0
<i>Salmonella spp.</i>	4,5-9,6	6,0-7,5

**FONTE:** Franco e Landgraf (2005)

**ANEXO D** - Valores de pH para multiplicação de alguns fungos e leveduras importantes em méis. \*Dados não disponíveis.

Fungos e leveduras	Valores de pH	
	Mínimo-máximo	Ótimo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,0 - *	4,0-5,0
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	1,5-10,5	3,5-5,5
<i>Aspergillus niger</i>	1,2 - *	3,0-6,0
<i>Aspergillus oryzae</i>	1,6-9,3	-
<i>Penicillium</i>	1,9-9,3	4,5-6,0

**FONTE:** Franco e Landgraf (2005)

**ANEXO E** - Lista cronológica que traz os avanços e marcos no desenvolvimento da irradiação de alimentos.

<b>Período</b>	<b>Acontecimento</b>
1896	H.Becquerel relata a descoberta da radioatividade.
1896	H.Minsch publica uma proposta para o uso da radiação ionizante para preservar alimentos pela destruição dos microrganismos deteriorantes.
1898	Pacronotti e Procelli observam o efeito da radiação nos microrganismos.
1902- 1903	Rutherford e Soddy publicam a teoria da desintegração radioativa. Marie Curie publica a tese sobre a natureza das partículas $\alpha$ , $\beta$ e $\gamma$ .
1904	S.C. Prescott publica estudos sobre o efeito bactericida da radiação ionizante.
1905- 1920	Período de pesquisas básicas sobre a natureza, química, física e os efeitos biológicos da radiação ionizante.
1923- 1927	Primeiras publicações acerca dos efeitos da radiação ionizante em enzimas. Primeira publicação relativa à ingestão de alimentos irradiados e seu caráter salutar.
1942- 1943	The Massachusetts Institute of Technology (MIT) demonstra a possibilidade de preservação de carnes por irradiação com raios-X.
1950	Início do programa de irradiação de alimento pela U.S. Atomic Energy Commission. O Reino Unido inicia o desenvolvimento de seu próprio programa de irradiação alimentar.
1953	Presidente D.Eisenhower lança o programa “Átomos pela paz”.
1958	The U.S. Food Additives classifica a irradiação de alimentos como aditivo.
1963- 1964	O FDA aprova a irradiação de bacon, trigo, farinha e batatas.
1980	O comitê de especialistas da FAO/IAEA/WHO declara que “a irradiação de qualquer alimento até uma média global de dose de 10 kGy não apresenta riscos toxicológicos, por isso testes toxicológicos de alimentos tratados por irradiação não são requeridos”.
1996	O número de países que têm permissão para irradiar um ou mais alimentos atinge 40 enquanto 28 países a aplicam comercialmente.

**FONTE:** Molins (2001)



