

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

THAÍS PATRÍCIA ALVES

**QUALIDADE DE MEIS DE ABELHAS *Apis mellifera* COMERCIALIZADO NO
ESTADO DE ALAGOAS**

RIO LARGO – AL
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA



THAÍS PATRÍCIA ALVES

**QUALIDADE DE MEIS DE ABELHAS *Apis mellifera* COMERCIALIZADO NO
ESTADO DE ALAGOAS**

RIO LARGO – AL

2013

THAÍS PATRÍCIA ALVES

**QUALIDADE DE MEIS DE ABELHAS *Apis mellifera* COMERCIALIZADO NO
ESTADO DE ALAGOAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: profa. Dra. Tania
Marta Carvalho dos Santos

RIO LARGO – AL

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

THAIS PATRÍCIA ALVES

**QUALIDADE DE MÉIS DE ABELHAS APIS MELLIFERA COMERCIALIZADO
NO ESTADO DE ALAGOAS.**

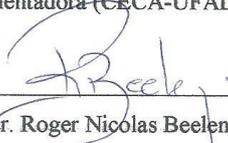
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 10/10/2013



Prof. Dr.ª Tania Marta Carvalho dos Santos
Orientadora (CECA-UFAL)



Prof. Dr. Roger Nicolas Beelen
Membro (CECA/UFAL)



Prof. Dr. Cicero Eduardo Ramalho Neto
Membro (CECA-UFAL)

Rio Largo – AL

2013

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

A474q Alves, Thais Patricia.
 Qualidade de méis de abelhas *Apis mellifera* comercializado no estado de Alagoas / Thais Patricia Alves. – 2013.
 61 f. : il.

 Orientadora: Tania Marta Carvalho dos Santos.
 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

 Bibliografia: f. 51-58.
 Apêndice: f. 59-61.

 1. Mel – Características físico-químicas. 2. Mel – Contaminação. 3. Mel – Análise qualitativa. 4. Mel – Microbiologia. I. Título.

CDU: 638.162

*A Deus.
Ao meu marido, Elias Junior.
Aos meus pais e irmãos, e aos meus
sobrinhos Davi e Lucas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus, que é meu alicerce e está sempre ao meu lado.

A minha Família, pelo incentivo incansável e companheirismo.

Aos companheiros de mestrado em especial a Moaceli Freire que será pra sempre uma grande amiga.

A todos que fazem o Programa de Pós Graduação em Zootecnia, técnico-administrativos, funcionários e professores, em especial a professora Angelina Bossi Fraga.

A minha orientadora Dr^a Tânia Marta Carvalho dos Santos, pela compreensão, paciência e por ter compartilhado suas experiências e conhecimentos.

A equipe do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio.

Ao presidente administrativo da cooperativa de mel, Lourival, pelo mel cedido.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas.

A FAPEAL e CAPES, pela bolsa.

Muito Obrigada!

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de amostras de méis comercializados no Estado de Alagoas. Foram adquiridas 15 amostras de mel de *Apis mellifera* L., provenientes de feiras livres e de cooperativa, todos situados no Estado de Alagoas. As amostras foram submetidas a análises físico-químicas e microbiológicas, visando verificar possíveis adulterações e estabelecer um padrão microbiológico do mel em questão. Com as análises físico-químicas ficou claro que todas as amostras estudadas apresentaram valores de pH ácidos variando entre 2,3 e 4,4, em relação às análises de atividade diastásica, reação de lugol que indica a presença de amido e dextrina e a relação à reação de Fiehe, que é um indicador qualitativo de HMF, todas as amostras apresentaram resultados insatisfatório em pelo menos um dos parâmetros. Quanto ao padrão microbiológico, 26,6% do total das amostras apresentaram contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas, 20% mostraram contagem de bolores e leveduras com valores acima dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira. Em relação à contagem de NMP.g⁻¹ de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, foi possível verificar que grande parte das amostras 86,7% apresentou um alto índice de contaminação. Os resultados do presente estudo demonstraram ainda a presença de bactérias esporuladas em 13,3% das amostras, identificadas por esfregaço em lâmina e coradas pelo método de Gram, tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose. De acordo com os resultados encontrados, percebe-se necessidade da implantação de programas de controle de qualidade na cadeia de produção e beneficiamento do mel, com rigor na fiscalização, além do desenvolvimento de novos padrões para análise microbiológica deste produto, visando garantir a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Produtos apícolas, Contaminação, Físico-química, Microbiologia, Boas práticas de fabricação.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the quality of honey sold in the State of Alagoas, Brazil. 15 honey samples of *Apis mellifera* L. were acquired from street market and cooperatives, all located in the State Alagoas. The characteristics physico-chemicals and microbiological were evaluated, in order to verify a possible adulteration and setting a microbiological standard for honey investigated. The physico-chemical analysis showed that all the samples studied presented pH values acid ranging between 2,3 and 4,4, for enzymatic activity, ligol reaction that are indicative of the presence of starch and dextrin and the Fiehe reaction, that a qualitative indicator of HMF, all the samples showed unsatisfactory result in at least of the parameters. As for microbiological standard, 26,6%, of the total of the samples showed high counts mesophilic aerobic bacteria standard, 20% showed counts of yeasts and moulds above the quality standards established by Brazilian law. in relation to enumeration coliform 35° and 45°, showed that the most samples were highly contaminated (86,7). The results showed that 13,3% samples were positive to the presence of *Clostridium botulinum*, identified by smear slide and stained by the Gram method, both under aerobic conditions as anaerobic conditions. According to the results presented, there is a necessity the implantation of quality control programs production chain and processed of honey, as effective supervision and the development of the new standards for microbiological analysis for honey, aimed to ensure the consumers' health.

Keywords: Apiculture products, Contamination, Physico-chemistry, Microbiology, Good manufacturing practices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Transformações sofridas pelo néctar.....	19
Figura 2 - Resultado para a análise de atividade enzimática.....	38
Figura 3 - Resultado para a reação de Iugol.....	40
Figura 4 - Resultado para a reação de Fiehe.	41
Figura 5 - Colônias de Bactérias Mesófilas isoladas em meio de Plate Cout Ágar....	43
Figura 6 - Colônias de Bolores e Leveduras isolados em meio de Martim.....	45
Figura 7 - Proteólise da carne e turbidez produzidas por bactérias em meio de Carne Cozida.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Maiores produtores de mel do mundo (2009).	16
Tabela 2 - Produção de mel no nordeste no ano de 2011.	16
Tabela 3 - Composição do mel (em % m/m).	18
Tabela 4 - Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo CODEX ALIMENTARIUS (2001) e pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) para méis florais produzidos por <i>Apis mellifera</i> L.	25
Tabela 5 - Valores de pH, atividade diastásica, reação de lugol e análise qualitativa de hidroximetilfurfural (Reação de Fiehe) em méis de abelhas <i>Apis mellifera</i> L. comercializados em Alagoas.	36
Tabela 6 - Parâmetros Microbiológicos de méis de abelhas <i>Apis mellifera</i> obtidos de apicultores autônomos e cooperativa no Estado de Alagoas.	42
Tabela 7 - Confirmação de Bacilos Gram positivos das culturas em meio AEY.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 História da Apicultura	14
2.2 Mel	17
2.3 Propriedades antioxidantes e antimicrobianas do mel	19
2.4 Colheita, extração e processamentos do mel	20
2.5 Padrão físico-químico	22
2.6 Pesquisa por adulterantes	25
2.6.1 Reação de Fiehe	26
2.6.2 Prova de Lund	26
2.6.3 Reação de Lugol	26
2.7 Contaminantes no mel	26
2.7.1 Contaminantes químicos	26
2.7.2 Contaminantes microbiológicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5 CONCLUSÃO	49
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
APÊNDICE	59

1 INTRODUÇÃO

Durante muitos anos as abelhas foram exploradas de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente, e as matando. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a lidar com as abelhas racionalmente sem causar prejuízo, hoje essa atividade que é milenar, atende ao tripé da sustentabilidade, pois traz benefícios à economia quando fornece renda ao produtor, a sociedade quando ocupa a mão de obra familiar ou contratada e ao meio ambiente por contribuir para a preservação da flora nativa (PAULA NETO E ALMEIDA NETO, 2006).

Com a apicultura, é possível explorar, produtos como: mel, pólen, geleia real, rainhas, própolis, apitoxina, cera, além da polinização e da comercialização de exames e crias. A atividade apícola também gera empregos nos serviços de manejo das abelhas, fabricação e comércio de equipamentos e beneficiamento dos produtos.

Dentre os produtos de origem apícola o mel é o de maior destaque. É um alimento saboroso e de excelente qualidade nutricional, dotado inclusive de propriedades terapêuticas. O mel é uma substância composta basicamente por açúcar e água, produzida pelas abelhas melíferas que coletam o néctar das flores, transformando-o, combinando e adicionando substâncias, para depois estocá-lo nas colmeias para servir-lhes de alimento. É comum encontrar variações na composição física e química do mel, pois vários fatores interferem na sua qualidade: florada, condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento.

Durante sua produção, o mel sofre algumas modificações físicas, químicas e organolépticas e após a sua colheita continua sofrendo essas modificações, gerando a necessidade de produzi-lo dentro de níveis elevados de qualidade, controlando todas as etapas do seu processamento, para garantir um produto de qualidade (ARAÚJO et al., 2006). O controle deste produto deve ser iniciado com o manejo das colmeias, destacando a escolha do local para a instalação do apiário até o processo de extração nas instalações da casa do mel (SOUZA, 2006).

Em virtude da busca pelo consumo de produtos naturais, o consumo de mel tem aumentado significativamente nos últimos anos em todo o mundo (BERTOLDI, 2008). Esta procura tem impulsionado melhorias na qualidade do mel produzido, visando à segurança alimentar através de um produto natural, livre de contaminantes e microrganismos e, assim, a aceitação do mesmo no mercado internacional.

O mel brasileiro é um produto diferenciado, rico em cores e aroma, devido à diversidade das floradas, as condições climáticas e ambientais favoráveis a uma maior produção, abundância de água e a rusticidade e eficiência das abelhas africanizadas. Por causas dessas características a demanda por mel brasileiro tem crescido no âmbito internacional, principalmente no ano de 2000 com o embargo ao mel Argentino e Chinês pela União Europeia.

No entanto, no ano de 2006 as exportações foram interrompidas, quando a União Europeia (UE) suspendeu a compra do mel brasileiro. A decisão foi baseada na persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos, já abordadas em missões técnicas anteriores. Para reverter esta situação, o Ministério da Agricultura implantou sistemas de Boas Práticas Apícolas (BPA) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP/APPCC) nos entrepostos e casas de mel no país (PEREZ, 2006). Com o fim do embargo, em março de 2008, as exportações foram normalizadas, porém, o país lutou para reconquistar as posições perdidas no ranking de exportações.

Apesar da crescente demanda deste produto tanto como alimento quanto como terapêutico e do papel de destaque do país na exportação, a legislação brasileira (BRASIL, 2000) não exige testes microbiológicos em amostras de mel, sendo estabelecido que sejam seguidas as práticas de higiene adequadas na manipulação do produto. Porém, os indicadores microbiológicos são importantes, pois evidenciam a necessidade de um controle higiênico sanitário quando se tem falhas durante a manipulação e conservação dos alimentos.

Com o crescimento deste mercado e em busca por produtos naturais, livres de adulterações, produtores e consumidores têm demonstrado grande interesse em determinar a qualidade do mel.

Dentre as formas de se avaliar a qualidade do mel, temos as análises físico-químicas, cujos resultados obtidos são comparados com os padrões ditados por órgãos oficiais internacionais ou com os estabelecidos pelo próprio país (MARCHINI, 2001). No Brasil, as análises físico-químicas indicadas pela legislação para o

controle de qualidade do mel puro são: umidade, acidez, cinzas, açúcares redutores e não-redutores, açúcares totais, pH, cor, sólidos insolúveis em água, atividade diastásica e hidróximetilfurfural (HMF) (BRASIL, 2000).

De acordo com MURATORI & SOUZA (2002), os microrganismos presentes no mel podem ser divididos em dois grupos, no primeiro estão aqueles inerentes ao mel e no segundo os de contaminação secundária, que estão diretamente relacionados à extração e ao beneficiamento do alimento. Entre os primeiros são encontrados os bolores e leveduras, que em condições adequadas de umidade e temperatura, não interferem na qualidade do mel e não são patogênicos. No segundo grupo estão as bactérias formadoras de esporos, como os clostrídios, podendo ser causadores de enfermidades.

Sendo o mel um produto muito apreciado e amplamente consumido, este trabalho tem como objetivo verificar a qualidade de méis comercializado no Estado de Alagoas, fazendo uma busca por adulterantes e possíveis falhas em seu processamento e análise do padrão microbiológico deste produto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História da Apicultura

As abelhas surgiram há cerca de 135 milhões de anos. São descendentes das vespas, que mudaram a alimentação deixando de se alimentar de pequenos insetos e aranhas para consumirem o pólen das flores dando origem a essas, desde então, elas vivem uma relação harmônica mutualista: a abelha encontra nas flores o néctar e o pólen necessários a sua sobrevivência; por sua vez, uma parte do pólen adere ao seu corpo e é transportada para longe, onde irá fecundar outra flor. O processo evolutivo das abelhas deu origem a várias outras espécies. Hoje se conhecem mais de 20 mil espécies, mas acredita-se que existam umas 40 mil espécies ainda não descobertas. Somente 2% das espécies de abelhas são sociais e produzem mel (EMBRAPA, 2003).

Na pré-história, o homem promovia verdadeira “caçada ao mel”, que era consumido em uma mistura de mel, cera, pólen e cria, pois não detinham o conhecimento para separar as substâncias (PEREIRA et al., 2003). Foi a civilização egípcia a primeira civilização que praticou a apicultura de forma racional, mas ainda muito rudimentar, pois os exames eram armazenados em potes, há aproximadamente 2.400 anos a.C., e desde aquela época, a abelha foi assumindo um papel de grande importância na vida do homem, sendo consideradas por alguns como sagradas (EMBRAPA, 2003).

Hoje a criação de abelhas melíferas, *Apis mellifera* L., é realizada em colmeias artificiais, utilizando métodos e equipamentos desenvolvidos especialmente para a sua cultura racional e exploração econômica (PERUCA et al., 2002).

Oficialmente a introdução das abelhas melíferas no Brasil se deu por meio do Padre Antonio Pinto Carneiro, com a autorização do Imperador Pedro II, através do Decreto nº 72 de 12 de julho de 1839, pois os imigrantes europeus perceberam que as espécies nativas tinham baixa taxa de produtividade quando comparadas as suas abelhas melíferas: *Apis mellifera mellifera* (abelha Alemã), *Apis mellifera ligustica* (abelha italiana), *Apis mellifera caucásica* (abelha Russa), *Apis mellifera carnica* (abelha carnica). As abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* foram introduzidas no Brasil em 1956, com o intuito de se executar um programa de

melhoramento genético para aumentar a produção de mel do país. Entretanto, devido a um acidente no apiário onde as rainhas estavam em quarentena, ocorreu uma enxameação, as abelhas que escaparam acasalaram com as abelhas melíferas europeias, anteriormente introduzidas no país, com isto surgiram populações poli-híbridas, denominadas africanizadas, com predominância de características das abelhas africanas, tais como a grande capacidade de enxamear e a rusticidade (KERR, 1967).

As abelhas africanizadas herdaram características das abelhas africanas, tais como a alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos e um ciclo de vida curto quando comparadas as espécies já existentes no país (GONÇALVES, 1994). Essas características podem ser as responsáveis pelo desenvolvimento da produção apícola brasileira para mel.

Com o conhecimento adquirido sobre a biologia da abelha, o desenvolvimento de técnicas adequadas no manejo, a apicultura se tornou uma das atividades agropecuárias de maior avanço no Brasil nos últimos anos (GONÇALVES, 1996).

A apicultura é uma atividade que está diretamente ligada ao desenvolvimento social, econômico e ambiental. Grande geradora de emprego e renda no campo o que diminui o êxodo rural promove crescimento da agricultura familiar e uso de forma sustentável dos recursos naturais.

Da apicultura é possível obter e comercializar produtos como: mel, cera, própolis, geleia real e o veneno (apitoxina). Nos últimos anos um segmento da apicultura que vem se desenvolvendo é o de serviços de polinização, em que as colmeias são alugadas para produtores de outra cultura agrícola com a finalidade de aumentar a produção desta cultura (FREITAS, 1998).

Em 2001, quando os maiores exportadores mundiais de mel tiveram suas exportações vetadas por questão de ordem sanitária, constatada pela presença de cloranfenicol, antibiótico cancerígeno, empregado no combate a doenças das abelhas na China e processos *antidumping* movido pelos Estados Unidos contra a Argentina, ocorreu uma surpreendente elevação nas exportações brasileiras, as abelhas brasileiras foram reconhecidas como resistentes a pragas e doenças e, por isso, não há nos meios, no Brasil, registros de contaminação com antibióticos. No entanto, em março de 2006, as exportações foram interrompidas, quando a União Europeia (UE) suspendeu a compra do mel brasileiro. A decisão foi baseada na persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos, já abordadas em

missões técnicas anteriores. Situação que foi revertida dois anos mais tarde, a partir da implantação de técnicas como BPA e APPCC nos entrepostos e casas de mel no país.

A produção brasileira de mel de abelha registrada no ano de 2011 foi de 41,578 mil toneladas, um crescimento de 9,4% maior do que aquela registrada no ano anterior (IBGE, 2011). De acordo com SEBRAE (2011) no ano de 2009, o Brasil era o 9º maior produtor de mel do mundo, os primeiros lugares são ocupados por China, Turquia e Argentina nessa ordem, que no ano de 2009 produziram 367, 82, 81 mil toneladas de mel respectivamente como é possível observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Maiores produtores de mel do mundo (2009).

Posição	País	Produção (t)
1º	China	367.219 ⁽¹⁾
2º	Turquia	82.003
3º	Argentina	81.000 ⁽¹⁾
4º	Ucrânia	74.000
5º	Estados Unidos	65.366
6º	Índia	65.000
7º	Rússia	53.598
8º	Etiópia	42.000
9º	Brasil	38.764
10º	Canadá	29.387

Fonte: FAO/ IBGE, 2011 – Elaboração Sebrae/PE, 2011.

⁽¹⁾ Dados estimados

Na Tabela 2, observamos à nível regional, que a produção nordestina está em ascensão. No ano de 2011, a produção anual foi de 16,9 mil toneladas, conquistando o primeiro lugar, antes ocupado pela região Sul (IBGE, 2011).

Tabela 2 - Produção de mel no nordeste no ano de 2011.

Estados	Quantidade (t)
Sergipe	114
Alagoas	213
Paraíba	303
Rio Grande do Norte	904
Maranhão	1.107
Pernambuco	2.350
Bahia	2.646
Ceará	4.165
iauí	5.108
Nordeste	16.911

Fonte: IBGE, Diretoria de pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa de Pecuária Municipal 2011.

No nordeste brasileiro têm surgido muitas oportunidades em função da apicultura, o que leva a ampliação do número de produtores e de projetos para o desenvolvimento de tecnologias para o incremento da produtividade e melhoria da qualidade do mel de abelhas africanizadas (ALMEIDA, 2012).

O Estado de Alagoas possui uma vegetação diversificada de floradas, abelhas africanizadas, condições climáticas favoráveis e um número crescente de apicultores, todas essas características são favoráveis à exploração da atividade apícola (PEREIRA & VILELA, 2003). A produção de mel no Estado em 2011 foi de 213 toneladas (IBGE, 2011). A apicultura de Alagoas é uma atividade recente e secundária, praticada em pequenos apiários fixos, com pouco manejo dos enxames, desconhecimento da flora apícola, falta de controle de qualidade do produto, e cooperativismo rudimentar. Essa realidade vem sofrendo muitas mudanças, pois pesquisas vêm sendo realizadas para melhoria e ampliação dessa atividade.

2.2 Mel

O mel é uma substância viscosa, açucarada e aromática, composta de diferentes açúcares, em sua maioria frutose e glicose, água e em menor quantidade por ácidos orgânicos, grãos de pólen, partículas de cera, pigmentos, compostos aromáticos, alcoóis, aminoácidos, dextrinas, enzimas, hormônios, vitaminas e minerais (Tabela 3). Além de certa concentração de fungos, algas, leveduras e outras partículas sólidas resultante de seu processamento (BRASIL, 2001; CODEX, 2001) que podem variar dependendo de sua origem, condições climáticas, estágio de maturação, processamento e armazenamento (SILVA et al., 2004).

Tabela 3 - Composição do mel (em % m/m).

Componentes	Valor Médio	Valores extremos
Água	17,2	13,4 – 23,9
Frutose	38,2	27,2 – 44,3
Glicose	31,3	22,0 – 40,8
Sacarose	1,31	0,350 – 7,57
Maltose	7,31	2,74 – 16,0
Polissacarídeos	1,50	0,130 – 8,49
Outros	3,10	0 – 13,2
Nitrogênio	0,040	0 – 0,133
Minerais	0,170	0,0200 – 1,03
Acidez Livres (a)	22,0	6,75 – 47,2
Lactonas (a)	7,11	0 – 18,8
Ácidos totais (a)	29,1	8,68 – 59,5
Valor do pH	3,91	3,42 – 6,10
Índice de Diástase (b)	20,8	2,10 – 61,2

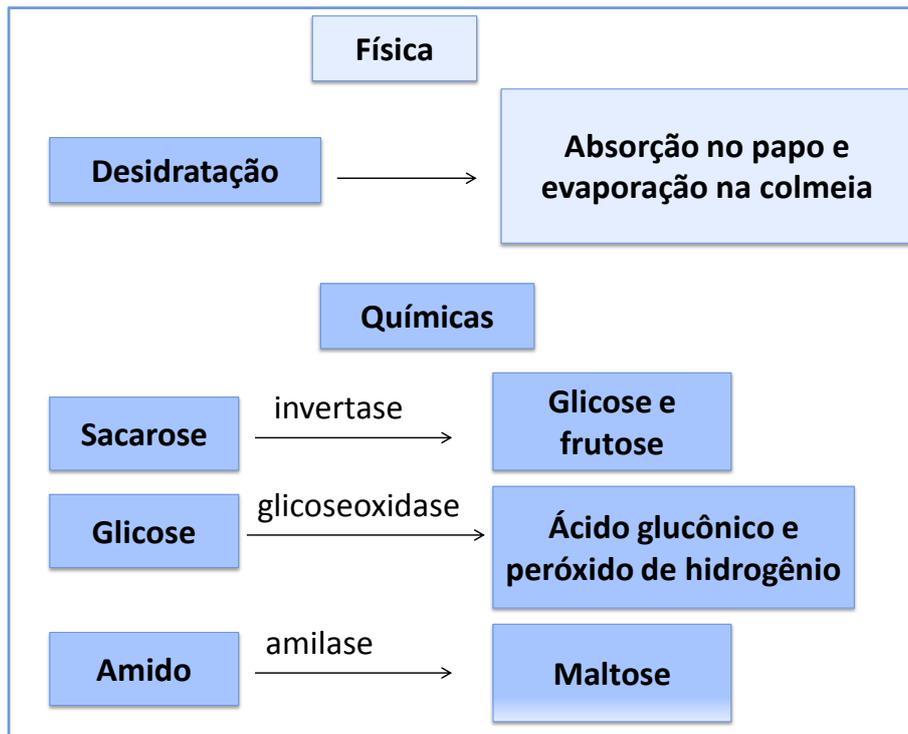
Legenda: (a) meq/kg; (b) U/g = g de amido desdobrando/100g de mel por hora a 40°C.
 Fonte: CAMPOS et al. (1987).

De acordo com o MERCOSUL (1994), o mel é um alimento, produzido pelas abelhas melíferas, que usam como matéria prima o néctar das flores ou das secreções das partes vivas das plantas ou excreções de insetos sugadores de plantas que permanecem sobre as partes vivas das plantas, que as abelhas colhem, transformam, combinam com substâncias próprias, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia.

Fatores como condições climáticas, tipo de florada, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento, podem interferir na composição físico-química de mel (SILVA et al., 2004).

A elaboração do mel resulta de duas modificações principais (processos) sofridas pelo néctar, uma física pela desidratação, através da evaporação na colmeia e absorção no papo, a outra reação química que atua sobre o néctar, transformando a sacarose, através da enzima invertase, em glicose e frutose. Ocorrem mais duas reações, em escala menor, que consiste em transformar o amido do néctar, através da enzima amilase em maltose e a enzima glicoseoxidase transforma a glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, este último, conhecido como água oxigenada. (LEGLER, 2001). Descrito em forma de esquema na Figura 1.

Figura 1 - Transformações sofridas pelo néctar.



Fonte: autora

2.3 Propriedades antioxidantes e antimicrobianas do mel

O mel é bastante reconhecido por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. A atividade antioxidante está relacionada com a ação de flavonoides, que são compostos fenólicos existentes no mel, os quais podem inibir radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular (SOCHA et al., 2009), de ácido ascórbico e de enzimas como a glucose oxidase, a catalase e a peroxidase (KUJAWSKI & NAMIÉSNIK, 2008).

A atividade antimicrobiana diretamente relacionada com a elevada pressão osmótica e baixa atividade da água (a_w) com valores de 0,5 a 0,6, deixando poucas moléculas de água livres para suportar o crescimento bacteriano; com a produção de peróxido de hidrogênio (pela ação da glucoseoxidase sobre a glucose); com a elevada acidez (inibindo o crescimento da maior parte dos microrganismos), com a viscosidade, que decresce rapidamente com o aumento de temperatura e com a presença de fitoquímicos (KUJAWSKI & NAMIÉSNIK, 2008).

2.4 Colheita, extração e processamentos do mel

Todo este tópico foi reescrito utilizando informações contidas em EMBRAPA (2003).

A escolha do local onde será instalado o apiário deve ser a primeira preocupação, ele deve ser próximo a fontes de néctar e pólen, também de fontes de água não contaminadas de fácil acesso as abelhas. Deve estar localizada distante de depósitos de lixo e esgotos. O local quando sombreado, contribui para a preservação da qualidade do mel, quanto à cor, umidade e teor de hidroximetilfurfural.

A colheita é um ponto crítico do processo de obtenção do mel, pois nesta etapa o produto está mais exposto a condições que podem interferir na sua qualidade – exigindo maiores cuidados com a manipulação, equipamentos e instalações (SILVA et al., 2004). É durante esse manejo que o apicultor terá o primeiro contato direto como o produto, no qual também se inicia um longo processo de susceptibilidade do produto, em relação às condições de manipulação, equipamentos, instalações e condições ambientais.

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelece regulamentos de funcionamento para os estabelecimentos que processam mel, exigindo deles programas de garantia da qualidade como Boas Práticas Apícolas (BPA) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), que são ferramentas adotadas para diminuir riscos de contaminação e a manutenção da qualidade do mel produzido.

O apicultor, durante a colheita, deve usar vestimentas adequadas e em ótimas condições de higiene. O manejo deve ser realizado preferencialmente em dias ensolarados, porém as melgueiras não devem ser expostas ao sol por longos períodos. Com relação ao uso da fumaça alguns cuidados devem ser tomados, como: utilizar exclusivamente resíduos de origem vegetal e que não apresente cheiro forte durante a queima. A fumaça não deve ser direcionada diretamente para os quadros, ela deve ser fria, limpa e livre de fuligem. A quantidade aplicada deve ser apenas a necessária para a retirada dos quadros de mel.

Quando a seleção dos quadros, o apicultor deve inspecioná-los, e priorizar a retirada daqueles que apresentarem no mínimo 90% de seus alvéolos operculados. Todos os equipamentos utilizados para a colheita do mel devem ser destinados

apenas para esse fim, de forma a se evitar qualquer possível contaminação do produto por substâncias presentes nesses utensílios. A melgueira deve ser mantida fechada e não pode ser colocada no chão ou piso do veículo durante o transporte até a unidade de extração do mel, neste momento uma lona pode ser usada para separar essas superfícies.

Na casa do mel, local destinado para a extração do produto, e onde também pode ser executado o seu processamento, a construção deve obedecer às normas sanitárias do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (portaria nº 006/986).

Para a extração do mel dos favos são necessários alguns equipamentos e utensílios especiais, que devem ser específicos para essa atividade e estar evidentemente limpos.

Para a desoperculação, quando o mel entra em contato direto com meio ambiente, deve-se utilizar a mesa desoperculadora, constituída de uma base que dá suporte aos quadros de mel, peneira e cuba para recebimento do resíduo de mel. A operação é realizada com garfo desoperculador que tem a função de retirar os opérculos.

De acordo com o método utilizado para a retirada do mel dos alvéolos, o mel pode ser classificado como: Mel escorrido, é aquele mel obtido por escorrimento dos favos desoperculados, sem larvas; Mel prensado, é aquele mel obtido por prensagem dos favos, sem larvas; Mel centrifugado, é aquele mel obtido por centrifugação dos favos, sem larvas, por meio de rotação, esse é o método adotado para obtenção do mel utilizado na presente pesquisa.

Depois de centrifugado, o mel passa por peneiras com malhas de diferentes diâmetros para uma eficiente filtragem. Esse produto é recebido por um balde que serve para transportá-lo até o decantador que tem a finalidade de deixar o mel “repousar”, fazendo com que bolhas e possíveis partículas presentes no mel fiquem sob a superfície e possam ser separadas durante o envase. No caso da necessidade da homogeneização do mel, este segue, após a decantação, para o homogeneizador por sistema manual ou por sistema mecanizado. Quanto a embalagens, tanto as de plástico como as de vidro são recomendadas, embora o vidro seja o material ideal para o acondicionamento do mel, inclusive como único material aceito para a exportação e para a certificação orgânica.

2.5 Padrão físico-químico

A legislação brasileira indica algumas análises físico-químicas para o controle da qualidade do mel como: umidade, hidroximetilfurfural (HMF), açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis em água e atividade diastásica.

Umidade

Por se tratar de uma substância densamente concentrada de açúcar, o mel é altamente higroscópico, pois absorve água com muita facilidade em ambientes com umidade relativa superior a 60% (BOGDANOV, 2010).

Na composição do mel, a quantidade de água deve variar entre 15 a 21%, de acordo com o clima, origem floral e colheita antes da maturação completa. Este parâmetro pode influenciar na viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade (HUCHET & COUSTEL, 2003). BOGDANOV (2010) resalta que este parâmetro é importante para avaliar a vida de prateleira visto que valores superiores a 17% podem favorecer ao desenvolvimento de certos microrganismos fermentadores.

De acordo com a legislação brasileira o mel deve apresentar no máximo 20 g de umidade/ 100g de mel analisado (BRASIL, 2000).

Hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF é um aldeído cíclico formado pela desidratação ácida de açúcares simples, como a glicose e frutose que são quebrados na presença de ácido glucônico e outros ácidos do mel (ALCÁZAR et al. 2006).

A importância da detecção do HMF no mel tem crescido uma vez que a quantidade deste composto é aumentada em méis submetidos a altas temperaturas (CRANE, 1983). LOUISE et al. (2009) argumentam que ainda não está definida se a exposição humana ao HMF representa um risco potencial à saúde, porém, ressaltam os seguintes pontos para discussão sobre o assunto: em concentrações elevadas é citotóxico, causa irritação nos olhos, no trato respiratório superior, na pele, nas mucosas e nas membranas.

O HMF é utilizado como indicador de qualidade, uma vez que apresenta baixas concentrações em um produto fresco, mas valores mais significativos

indicando alterações importantes provocadas pelo aquecimento, estocado em condições inadequadas ou adulteração com xarope de açúcar invertido. Além disso, o conteúdo de HMF no mel também pode ser afetado pela acidez, pH, conteúdo de água e minerais (WHITE JÚNIOR, 1979). A legislação aceita no máximo 60mg/Kg de hidroximetilfurfural no mel (BRASIL, 2000).

Açúcares Redutores

Açúcares e água são os principais componentes do mel. Em que os monossacarídeos frutose e glicose representam 80% e os dissacarídeos sacarose e maltose apenas 10% da quantidade total (WHITE, 1975). Os teores de frutose e glicose são classificados como açúcares redutores, por estarem em maior quantidade são importantes para o estabelecimento de uma série de alterações físicas na viscosidade, densidade, higroscopicidade e cristalização do mel (CAMPOS, 1987). De acordo com a instrução normativa nº 11 de 2000, a quantidade de açúcares redutores para mel floral é de no mínimo 65 g/100g de mel (BRASIL, 2000).

Sacarose Aparente

Sacarose aparente é um dissacarídeo não-redutor, composto por duas moléculas de açúcares redutores (glicose e frutose) unidas em ligação glicosídica (LEHNINGER, 2002). Sabendo a concentração de sacarose é possível diferenciar os méis monoflorais dos poliflorais (CARILLO MAGANA, 1998). A sacarose aparente para o mel floral deve ser no máximo de 6 g/ 100g de mel e para o mel de melato de no máximo de 15 g/ 100g de mel segundo a instrução normativa nº 11 de 2000 (BRASIL, 2000).

Sólidos Insolúveis

Os sólidos insolúveis são as partículas do mel que não são solúveis em água a 80°C. Corresponde a mais importante medida de controle higiênico, pois permite a detecção de impurezas presente no mel (SILVA et al., 2006).

O valor máximo permitido é de 0,1g/100g de mel, exceto para o mel prensado que se tolera até 0,5 g/100g, unicamente em produtos acondicionados para sua venda direta ao público (BRASIL, 2000).

Cinzas

Trata-se do resíduo inorgânico de um alimento após a queima da matéria orgânica. FERNÁNDEZ-TORREZ (2005) estudando o conteúdo mineral de méis de diferentes origens botânicas descreveu o potássio, cálcio e fósforo como elementos mais abundantes, deixando claro que o solo no qual a planta nectarífera se encontra plantada influencia a quantidade de minerais presentes nas cinzas.

Determina algumas irregularidades como a falta de higiene e a não decantação e ou filtração no final do processo de coleta do produto (EVANGELISTA–RODRIGUES, 2005). O máximo de cinzas permitido é de 0,6g/100g de mel, porém no mel de melato e suas misturas com mel floral tolera-se até 1,2g/100g de mel (BRASIL, 2000).

Ácidos

O mel é um alimento ácido por possuir pH médio de 3,9, e esta acidez é importante tanto para preservação, por dificultar a ação de microrganismos, como também para realçar seu sabor. O principal ácido presente no mel é o ácido glucônico, embora existam outros, como o fórmico, acético, benzóico, butírico, cítrico, iso-valérico, láctico, maleico, málico, oxálico, fenilacético, propiônico, piroglutânico, succínico e valérico. A acidez no mel pode estar diretamente relacionada com a composição floral nas áreas de coleta e pelas condições de solos, uma vez que o mesmo poderá ser influenciado pelo pH do néctar (CRANE, 1983).

Os ácidos orgânicos do mel representam menos que 0,5% dos sólidos, tendo um pronunciado efeito no sabor, podendo ser responsáveis, em parte, pela excelente estabilidade do mel em frente a microrganismos (EMBRAPA, 2003). A legislação aceita acidez máxima de 50 mEq/Kg de mel (BRASIL, 2000).

Atividade Diastásica

A diástase do mel é uma enzima produzida pelas abelhas e transferida ao néctar. Muitas enzimas são encontradas no mel: invertase, α -amilase, β -amilase, α -glucosidase e a glucoseoxidase que é capaz de transformar a glicose em ácido glucônico. O mel contém também uma catalase e uma fosfatase. Sendo as diástases destruídas pelo aquecimento exagerado do mel (HUCHET & COUSTEL, 2003).

A atividade diastásica varia com a origem botânica do mel é quantificada usualmente através da α -amilase, que é uma das enzimas do mel sensível ao calor,

podendo desta forma indicar o grau de conservação e superaquecimento do produto (WHITE JÚNIOR, 1994), sua ausência pode indicar adulterações realizadas no mel, com uso de temperatura acima de 60°C durante o beneficiamento, adição de açúcar invertido, condições de armazenamento inadequadas (tempo acima de seis meses e temperaturas elevadas). A atividade diastásica diminui devido à desnaturação parcial ou total das amilases (AROUCHA et al., 2008).

A legislação permite atividade diastásica como mínimo 8 na escala Göthe. Os méis com baixo conteúdo enzimático devem ter como mínimo uma atividade diastásica correspondente a três na escala Göthe, desde que o conteúdo de HMF não exceda a 15mg/Kg (BRASIL, 2000).

Na Tabela 4 estão relacionados todos os parâmetros de acordo com as legislações nacionais e internacionais vigentes.

Tabela 4 - Parâmetros de qualidade estabelecidos pelo CODEX ALIMENTARIUS (2001) e pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) para méis florais produzidos por *Apis mellifera* L.

Parâmetro	CODEX (2001)	BRASIL (2000)
Umidade em % (máximo)	20	20
Açúcares redutores em % (mínimo)	60	65
Sacarose aparente em % (máximo)	5	5
Sólidos insolúveis em água em % (máximo)	0,1	0,1
Conteúdo mineral (Cinzas) em % (máximo)	0,6	0,6
Acidez em meq.Kg ⁻¹ (máximo)	50	50
Atividade de Diastase em U.D* (mínimo)	8**	8
Hidroximetilfurfural em mg. Kg ⁻¹ (máximo)	40 (80***)	60

*U.D.- Unidades de diástase na escala de Gothe; **Aceita-se 3 desde que o HMF não exceda 15 ***países tropicais

2.6 Pesquisa por adulterantes

A adulteração em mel é em geral feita com a adição de carboidratos, principalmente açúcares comerciais como glicose comercial, solução ou xaropes de sacarose e solução de sacarose invertido, proveniente da cana de açúcar ou milho (ROSSI et al. 1999).

O mel é um produto de produção limitada e alto custo, o que pode ser a razão da prática da adulteração, que é facilitada pela dificuldade em identificar os adulterantes incorporados ao alimento, assim como a dificuldade em identificar os criminosos e da impunidade no país (VARGAS, 2006).

2.6.1 Reação de Fiehe

A presença de HMF pela reação de Fiehe indica adulterações no mel por xaropes e glicose comercial ou ainda superaquecimento. A cor vermelha persistente indica positividade ou presença elevada de HMF (possivelmente mais de 200 mg/Kg) (LEAL et al., 2001).

2.6.2 Prova de Lund

Indica a presença de substâncias albuminoides, componentes normais no mel e que são precipitados pelo ácido tânico adicionado na amostra. Na presença de mel natural esse precipitado forma um depósito de 0,6 a 3,0mL no fundo da proveta. No entanto, a reação não ocorre em mel artificial e, no caso de mel adulterado, o volume do precipitado aparecerá em menor quantidade (BERTOLDI et al., 2004).

2.6.3 Reação de Lugol

WIESE (2000) constata que ao utilizar o iodo e iodeto de potássio (Iugol), o mel adulterado apresenta reação colorida característica em função da presença de amido e dextrina, o que não ocorre no mel puro.

2.7 Contaminantes no mel

Contaminantes são todas as substâncias que não foram adicionadas de forma intencional aos alimentos. Podem estar presentes durante a colheita, processamento, transporte ou armazenamento e podem também resultar de contaminação ambiental.

No mel, os contaminantes podem ser procedentes do ambiente ou das práticas apícolas, originados a partir de produtos para o tratamento de doenças das abelhas, dos materiais da colmeia, da cera contaminada, dos protetores da madeira, do equipamento usado na extração de mel (Bogdanov, 2006)

2.7.1 Contaminantes químicos

Dentre os contaminantes que podem acometer o mel estão: antibióticos (Penicilina, Estreptomicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Eritromicina, Neomicina, Oxitetraciclina, Clortetraciclina); Sulfonamidas (Sulfadimetoxina, Sulfametazina, Sulfatiazol); outras drogas (Nitrofurazona e Furazolidona) e Metais Pesados

(Arsênio, Chumbo, Cádmiio) (BRASIL, 2007). A abelha explorada no Brasil (Africanizada) apresenta como principal característica a resistência às pragas e doenças e, por isso, não há nos méis no Brasil registros de contaminação com antibióticos.

Quando se refere aos metais pesados, alguns trabalhos apontam a presença destes no mel, sendo o Pb e Cd os mais comuns, por estarem presentes no solo, podendo alcançar as matérias-primas de produtos apícolas (néctar, pólen e exudado de plantas) por ar, água, solo e plantas e, em seguida, ser transportada para a colmeia pelas abelhas (BOGDANOV, 2006).

2.7.2 Contaminantes microbiológicos

O mel é um alimento que apresenta pH ácido, umidade e atividade da água baixa (*aw*), viscosidade elevada, concentração de açúcares e pressão osmótica alta, condições que fazem com que o mel uma substância pouco favorável ao desenvolvimento bacteriano. Por outro lado, o mel tem propriedades que inibem ou destroem a maior parte dos microrganismos. Os microrganismos que podem estar presentes no mel são os que suportam a concentração elevada de açúcar, acidez e caráter antimicrobiano do mel, principalmente leveduras, fungos e bactérias formadoras de esporos (SNOWDON & CLIVER, 1996).

A presença de microrganismos também varia, podendo ser introduzidos pelas próprias abelhas que incluem o pólen, o trato digestivo das abelhas, poeira, ar, sujeiras e o néctar das flores, as quais são de difícil controle e podem ser introduzidas pela falta de higiene na manipulação ou durante a extração e beneficiamento do mel, através de feridas infectadas, espirros e contaminação fecal; a contaminação cruzada a partir de animais ou produtos animais; equipamentos, a partir de resíduos de alimentos ou água; o que pode ser evitado se adotadas Boas Práticas de Fabricação (SNOWDON & CLIVER, 1996; LOPES, 2008).

A legislação Brasileira (BRASIL, 2000) e Internacional (MERCOSUL, 1999) não estabelecem os padrões microbiológicos para o mel de abelhas. No Brasil, essas exigências faziam parte do regulamento técnico de identidade e qualidade do mel (BRASIL, 1997). A principal hipótese para retirada destes parâmetros é fundamentada pelas características do mel que são baixa atividade de água, alta concentração de açúcares e baixo pH, conferindo-lhe, uma proteção natural contra microrganismos.

A partir da análise microbiológica é possível verificar quais e quantos microrganismos estão presentes, são de fundamental importância para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer à saúde do consumidor e se o alimento terá ou não vida útil pretendida. Essa análise é indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicas para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidas adequadamente.

Por causa de tais riscos à saúde humana, a preparação do mel deverá ser realizada de acordo aos Princípios Gerais sobre Higiene de Alimentos recomendados pela Comissão do Codex Alimentarius, FAO/OMS.

A legislação brasileira não estabelece um padrão específico para o mel, portanto, o critério microbiológico utilizado encontra-se no regulamento técnico dos princípios gerais para açúcares, adoçantes e similares no anexo II da Agência de Vigilância Sanitária de Janeiro de 2001. Neste regulamento se preconiza a ausência de coliformes totais NMPg^{-1} e presença de no máximo 100 UFCg^{-1} de bolores e leveduras.

Bactérias heterotróficas mesófilas

A contagem dessas bactérias é importante para indicar a qualidade higiênica sanitária dos alimentos, mesmo que os patógenos estejam ausentes e/ou que não tenham ocorrido alterações sensoriais no alimento, uma contagem alta aponta que o alimento não é seguro para o consumo (JAY, 2005).

Fungos filamentosos e leveduras

O crescimento de bolores e leveduras raramente é responsável pela deterioração do mel, seu crescimento é mais lento do que o de bactérias em alimentos de baixa acidez e alta atividade de água. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O perigo à saúde pública está associado à produção de micotoxinas pelos fungos filamentosos. Os fungos encontrados em mel pertencem aos gêneros *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus*, e estes podem sobreviver nesse alimento, mas não necessariamente, se reproduzem; portanto, contagens elevadas desses microrganismos podem indicar uma contaminação recente pelo ambiente da abelha, colmeia ou equipamento de processamento do produto (SNOWDON; CLIVER, 1996).

As leveduras podem se desenvolver em condições de pH reduzido e não são inibidas pela sacarose, portanto é possível a presença de leveduras osmofílicas no mel, podendo causar fermentação (SNOWDON; CLIVER, 1996).

Coliformes a 35°C e 45°C

Os coliformes fecais a 35°C que junto aos bolores e leveduras indicam a higiene associada à manipulação, já os coliformes a 45°C avaliam o estado higiênica sanitária, podendo esses ser causadores de doenças (MURATORI & SOUZA, 2002).

Coliformes a 35°C são compostos pelas bactérias *Enterobacteriaceae* e se apresentam como bacilos gram-negativos, não formadores de esporos e capazes de fermentar a lactose com produção de gás. Podem ser encontrados nas fezes, estão presentes em vegetais e solo, nos quais permanecem por um tempo bem maior do que as bactérias patogênicas de origem intestinal como a *Salmonella* e *Shigella* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os Coliformes a 45°C apresentam a capacidade de continuar fermentando lactose com produção de gás. Dentre os demais gêneros, a mais estudada é a *Escherichia coli* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Pertencentes ao grupo de microrganismos indicadores, esses fornecem informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, além de visualizar condições inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Clostridium botulinum

A incidência de esporos de *Clostridium botulinum* no mel tem sido estudada, pois, são frequentemente relacionados com a incidência de botulismo infantil, pois acomete crianças com idade inferior a 12 meses, como resultado da absorção de toxina botulínica e desenvolvimento da doença devido à imaturidade da flora intestinal, e o mel foi o único alimento descrito como veículo deste microrganismo (MIDURA et al., 1979).

Em um estudo realizado por RAGAZANI et al. (2008), é destacado a importância do botulismo como um problema de saúde pública. Tal preocupação se deve ao fato de o botulismo ser um tipo severo de intoxicação alimentar causado pela ingestão de uma potente neurotoxina formada durante o crescimento deste microrganismo, cujos esporos estão frequentemente distribuídos na natureza.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do Experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de microbiologia da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA-UFAL), localizado no município de Rio Largo.

3.2 Obtenção das amostras e período de amostragem

As amostras de méis foram adquiridas em feiras livre e cooperativa situadas no Estado de Alagoas. No período de novembro a dezembro de 2012, foram obtidas 15 amostras de mel de *Apis mellifera* L., dos quais 5 foram adquiridas em embalagens comerciais próprias dos apiários independente de terem sido produzidos neste estado, regularizados (possuíam algum selo de inspeção) ou não, de diferentes regiões apícolas do Estado de Alagoas e outras 10 cedidas pela coopmel (Cooperativa de Mel em Alagoas). Todas as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas, onde foram analisadas.

3.2.1 Processamento das Amostras

As amostras foram divididas em cinco grupos de três unidades para facilitar a manipulação das mesmas. Em camará fluxo, a superfície da embalagem de mel foi desinfetada com algodão embebido em álcool 70% e aberta assepticamente. Os procedimentos utilizados no preparo das amostras seguiram as recomendações descritas no Compendium of the Microbiological Examination of Foods (VANDERZANT; SPLITTSTOESSER, 1992). De cada amostra, foram pesados 25 g e transferidos para uma mamadeira contendo 225 mL de água peptonada 0,1%, sendo esta mistura homogeneizada por trinta minutos. A partir desta diluição (10^{-1}), foram transferidos 10 mL para 90 mL formando as diluições 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . Todos os materiais e meios foram previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 20

minutos, com exceção das vidrarias que foram esterilizadas em estufa a 160° por 2 horas.

3.3 Análises físico-químicas (adulterantes)

As seguintes análises foram realizadas segundo os métodos recomendados para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2005).

3.3.1 Determinação do pH

Foi realizada utilizando um pH-metro digital marca PHTEK, pH 100. 10,0g de mel foram diluindo em 10 mL de água para medição do pH usando-se o pH-metro previamente calibrado.

3.3.2 Determinação da atividade diastásica

Através deste teste pode-se determinar a presença de fermentos diastásicos.

Para a determinação da atividade diastásica, em tubos de ensaio, misturou-se 5 mL de solução de mel a 20% mais 5 mL de água destilada e 1 mL de solução de amido a 1%. Em seguida foram incubados em banho-maria a 45°C por 1 hora exatamente e, então, acrescentou-se 1 mL da solução de lugol.

O teste foi positivo quando formou uma coloração parda clara, indicando que o mel era legítimo e que possuía atividade diastásica. E negativo, quando adquiriu cor azul, representando um mel sem atividade diastásica, mel artificial, incapaz de hidrolisar o amido.

3.3.3 Reação Lugol

O teste indica a presença de amido e dextrinas ou açúcares comerciais. Pesou-se 10,0 g de cada amostra em beakers de 50 mL e foram adicionados 10 mL de água agitando-se. Pipetou-se 1 mL de solução de lugol em cada amostra. O teste foi negativo quando a coloração final das amostras era próxima a do mel, indicando

a ausência de amido e dextrina, As amostras que adquiriram cor vermelho-violeta a azul foram positivas quanto à presença de amido e dextrina.

3.3.4 Prova qualitativa HMF: reação de Fiehe

Para a realização do método, foram agitados vigorosamente em tubos de ensaio 5g de mel com 5 mL de éter etílico. Foram deixados em repouso até tornar-se clara a camada etérea. Em seguida, foi transferida a camada etérea para outro tubo de ensaio e adicionadas 5 gotas de solução recente de resorcina a 1% em HCl concentrado.

Agitou-se e observou a coloração que adquiriram as gotas de resorcina no fundo do tubo de ensaio.

A coloração vermelha cereja imediata ou salmão pode indicar a presença de açúcar invertido por tratamento ácido, aquecimento intenso ou estocagem prolongada em temperatura ambiente elevada.

3.4. Análise microbiológica

3.4.1 Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos

O método de Contagem Padrão em Placas (CPP) estima o número de células viáveis contidas em um alimento qualquer. Este método é utilizado para obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Para esta avaliação, foram pipetados 1 mL de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em triplicata, as quais foram inoculadas em superfície de placas de Petri estéreis contendo ágar padrão para contagem (PCA) e espalhado com alça de Drigalski previamente imersa em álcool etílico e flambada, cobrindo toda a superfície das placas, as quais foram incubadas por 48 horas a 37° C. As placas com contagens entre 30 e 300 UFC foram selecionadas e as colônias foram contadas, respectivamente. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.4.2 Bolores e leveduras

Os bolores são fungos unicelulares de forma esférica, ovoide, cilíndrica. Os fungos são talvez a causa mais comum de deterioração de alimentos estocados em ambientes domésticos.

Para contagem de bolores e leveduras em placas utilizando o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC), alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} foram inoculadas em triplicata na superfície de placas de Petri estéreis e espalhadas com alça de Drigalski previamente imersa em álcool etílico e flambada. A incubação foi feita a uma temperatura de 25°C por cinco dias; após este período, considerou-se para contagem somente as placas da mesma diluição que apresentaram de 30 a 300 colônias. As Unidades Formadoras de Colônias foram calculadas através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC g} = \frac{\text{X.FD}}{\text{V}}$$

Onde;

X = Média de cada diluição

FD = Fator de diluição

V = Volume da diluição adicionado à placa de Petri

3.4.3 Determinação do NMP de coliformes

Na determinação do NMP (Número Mais Provável) de coliformes totais e termotolerantes, foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, conforme metodologia descrita pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1991).

Essa técnica compreende duas fases distintas: o teste presuntivo, que visa detectar a presença de microrganismos fermentadores da lactose, especialmente o grupo coliforme. Células estressadas por tratamentos térmicos, pelo congelamento ou outro motivo, podem ser recuperadas nessa fase e o teste confirmativo, em que se determina a população real de coliformes totais e termotolerantes.

No teste presuntivo foram selecionadas três diluições adequadas da amostra e inoculada séries de três tubos contendo 10 mL Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e tubos de Durhan invertidos com cada uma das diluições decimais preparadas.

Colocados, em cada tubo com o Caldo Lauril, 1,0 mL do inoculo. Após a incubação em estufa a 37°C por 48 horas, as bactérias do grupo dos coliformes foram confirmadas com produção de gás. No teste confirmativo, de cada amostra positiva, foram realizadas sementeiras adicionando 2 mL do tubo contendo Caldo Lauril Sulfato em tubos de ensaio com Caldo Verde Brilhante, que contém inibidores de crescimento da microbiota, especialmente gram-positivas. Incuba-se em estufa a 37°C por 48 horas.

Então, a produção de gás nos tubos indica que houve desenvolvimento de bactérias Gram-negativas que fermentam lactose, características do grupo coliforme. Para a qualificação dos coliformes a 45°C, os tubos positivos de Lauril Sulfato também foram adicionados 2 mL em Caldo EC (*Escherichia coli*), incubados por 24 horas a 44° C. A produção de gás nos tubos de Duran indicou que houve desenvolvimento de bactérias Gram negativas. Os resultados foram anotados e consultados em tabela para NMP (Número Mais Provável).

3.4.4 Clostrídios Sulfito Redutores

3.4.4.1 Sementeira direta

Foi adicionado 1 mL de cada diluição seriada decimal em triplicata em 10 mL de meio de carne cozida CMM (*Cooked Meat Medium*). Imediatamente os tubos foram levados ao banho-maria a 65°C por 30 minutos, a fim de inativar a microbiota não esporulada. As amostras foram incubadas em estufa a 35°C por sete dias. Após o período de incubação, as culturas foram observadas quanto à turbidez, produção de gás, digestão das partículas de carne no caldo. As culturas com crescimento insignificante foram reincubadas na estufa na mesma temperatura utilizada anteriormente por mais três dias, completando um período máximo de dez dias. As culturas ainda sem crescimento foram descartadas por serem consideradas negativas.

3.4.4.2 Isolamento

As amostras positivas foram submetidas ao método de Gram, para detecção de bacilos Gram positivos esporulados ou não. As culturas positivas foram sementeiras em placas de Petri contendo Anaerobic Egg Yolk Agar (AEY), e incubadas em anaerobiose em jarra Colorina, a 35°C por sete dias. As colônias

típicas obtidas foram reisoladas em duplicata em placa contendo meio AEY e uma de cada foi incubada aerobicamente e anaerobicamente em jarra Colorina, ambas a 35°C por 48 horas. Posteriormente, foi realizada uma coloração pelo método de Gram em lâminas com material biológico retirado das placas semeadas para detecção de bacilos Gram positivos.

Para a análise dos dados foram utilizadas as médias das repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após analisar a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* produzido no Estado de Alagoas foram obtidos resultados físico-químicos e microbiológicos que possibilitaram dizer qual dentre os méis apresentaram-se dentro dos parâmetros estabelecido pela legislação (BRASIL, 2000).

4.1 Análises físico-químicas

As provas de adulterações foram realizadas de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 5 - Valores de pH, atividade diastásica, reação de lugol e análise qualitativa de hidroximetilfurfural (Reação de Fiehe) em méis de abelhas *Apis mellifera* L. comercializados em Alagoas.

Amostras	pH	Atividade diastásica	Reação de lugol	Prova de Fiehe
MM1	2,4	-	+	-
MM2	2,7	-	-	+
MM3	3,0	-	-	+
MM4	2,5	-	+	+
MM5	2,3	-	+	-
MC6	2,8	-	-	-
MC7	3,5	+	-	+
MC8	3,1	-	-	+
MC9	3,6	-	-	+
MC10	4,4	+	-	+
MC11	3,3	-	-	-
MC12	3,6	-	-	+
MC13	3,0	-	-	+
MC14	3,0	-	-	+
MC15	3,4	-	-	+

De acordo com a tabela 5, observa-se os resultados das análises físico-químicas para valores de pH, atividade diastásica, reação de lugol e análise qualitativa de hidroximetilfurfural (Reação de Fiehe), em méis do Estado de Alagoas.

A legislação brasileira (BRASIL, 2000) não estabelece um valor máximo ou mínimo de pH, porém em níveis muito elevados ou muito baixos de pH, pode favorecer o crescimento de microrganismos que afetam a qualidade do mel

(VARGAS, 2006). A legislação anterior (BRASIL, 1985) estabelecia valores entre 3,3 a 4,6, sendo assim 60% das mostras encontram-se com o pH abaixo dos valores anteriormente preconizados.

O pH é influenciado pelo pH do néctar, solo ou associação de vegetais para a composição do mel, sendo que substâncias presentes na mandíbula das abelhas são acrescentadas durante o transporte até a colmeia o que pode alterar este fator. Todas as amostras estudadas apresentaram valores de pH ácidos variando entre 2,3 e 4,4, devido à presença de ácidos orgânicos que contribuem para o sabor do mel e estabilidade contra o desenvolvimento microbiano. Valores similares (2,89 a 3,22) foram encontrados por SANTOS (2010) que estudou sete amostras de méis comercializados na cidade de Tabuleiro do Norte-CE

Na literatura, os valores de pH variam entre 4,37 e 4,58 como relataram SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010). SALGADO et al. (2008) analisaram 14 amostras de méis de diferentes origens botânicas comercializados nas cidades do interior de São Paulo e obtiveram uma media de 4,22. Muitos ácidos são adicionados a partir das transformações dos açúcares sofridas pelas enzimas produzidas por abelhas. O principal é o ácido glucônico, que resulta da oxidação da glicose pela glucoseoxidase (BOGDANOV et al., 2010).

Analisando atividade enzimática apenas dois (13,3%) méis MC7 e MC10 tiveram resultado positivo que foi indicado de acordo com a coloração parda clara, Figura 2. O índice de diástase é o parâmetro mais importante de qualidade do mel, pois indica se a amostra sofreu superaquecimento ou adulteração, e ainda fornece indicações sobre o grau de conservação, o que comprometeria seriamente o produto.

Figura 2 - Resultado para a análise de atividade enzimática.



Fonte: autora

O aquecimento do mel pode provocar a degradação de componentes químicos importantes, do ponto de vista nutricional e funcional. A diástase é destruídas pelo aquecimento exagerado do mel (HUCHET & COUSTEL, 2003), por ser sensível ao calor, assim resultados negativos para a presença desta enzima é uma indicação de superaquecimento no mel, no entanto esta enzima não está presente nos xaropes de açúcar invertido, preparado por aquecimento e inversão ácida de sacarose de cana, e a adição deste tipo de xarope ao mel diminuiria o

índice de diástase do produto, na mesma proporção da fraude, pois trata-se de uma enzima produzida pelas abelhas adicionada ao néctar (CRANE, 1983).

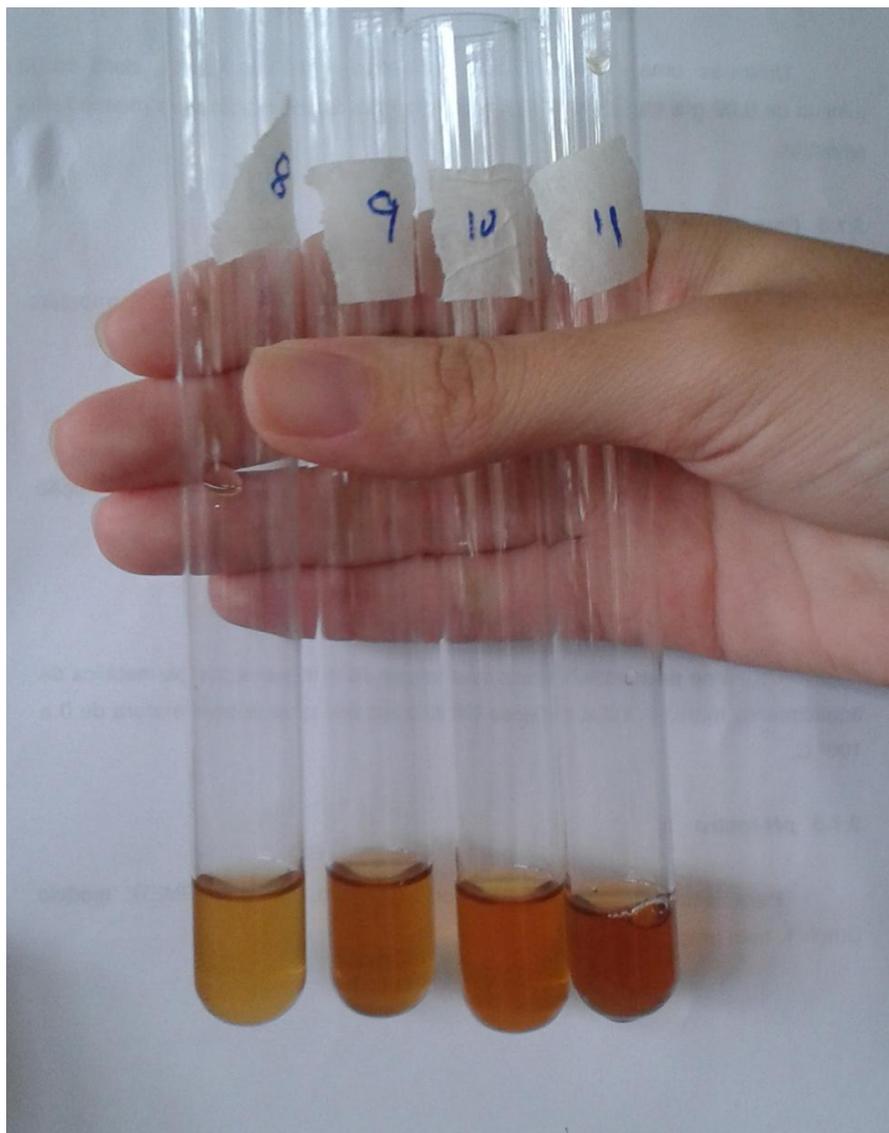
A atividade diastásica varia com a origem botânica do mel, sendo que o valor mínimo permitido na legislação (BRASIL, 2000) é de 8,0 unidades de diástase. Entretanto, ao interpretar os resultados da atividade de diástase, deve-se considerar que alguns méis monoflorais possuem uma atividade baixa natural, implicando em uma análise que tem um poder limitado como indicadora de deterioração (BOGDANOV et al., 2010).

VARGAS (2006) estudando méis de 20 municípios dos Campos Gerais encontrou teores que variaram de 1,19 a 47,14. SODRÉ et al. (2002) verificaram valores entre 16,66 a 62,8 em méis do litoral norte da Bahia. Porém, os autores sugerem ainda que para confirmação da adulteração, sejam analisados outros parâmetros, como qualitativas de lugol e Fiehe. Visto que existe uma correlação quanto à presença de atividade diastásica e a concentração de hidroximetilfurfural aqueles méis que apresentarem um índice de diástase baixo, possivelmente, possuirão um teor alto de HMF, indicando uma conservação inadequada do produto ou por consequência de um tratamento térmico intenso.

Para reação de lugol, houveram resultados positivos indicando a presença de amido e dextrina em três (20%) amostras. No restante foi apresentada coloração final próxima a do mel, indicando neste caso, que o mel era puro, como exposto na Figura 3. Enquanto PÉRICO et al. (2011) que analisaram 30 amostras de mel de abelhas, adquiridas em supermercados, farmácias, feiras e Associação dos Apicultores de Toledo-PR não observaram resultado positivo em nenhuma das amostras analisadas, resultado semelhante àquele encontrado por SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010).

O teste de Lugol é um indicador de adulteração, pois quando ocorre adição de glicose comercial ou amido, provoca uma reação entre o iodo e o iodeto de potássio com a glicose, apresentando coloração do vermelho ao violeta que depende da concentração de amido e dextrina no produto.

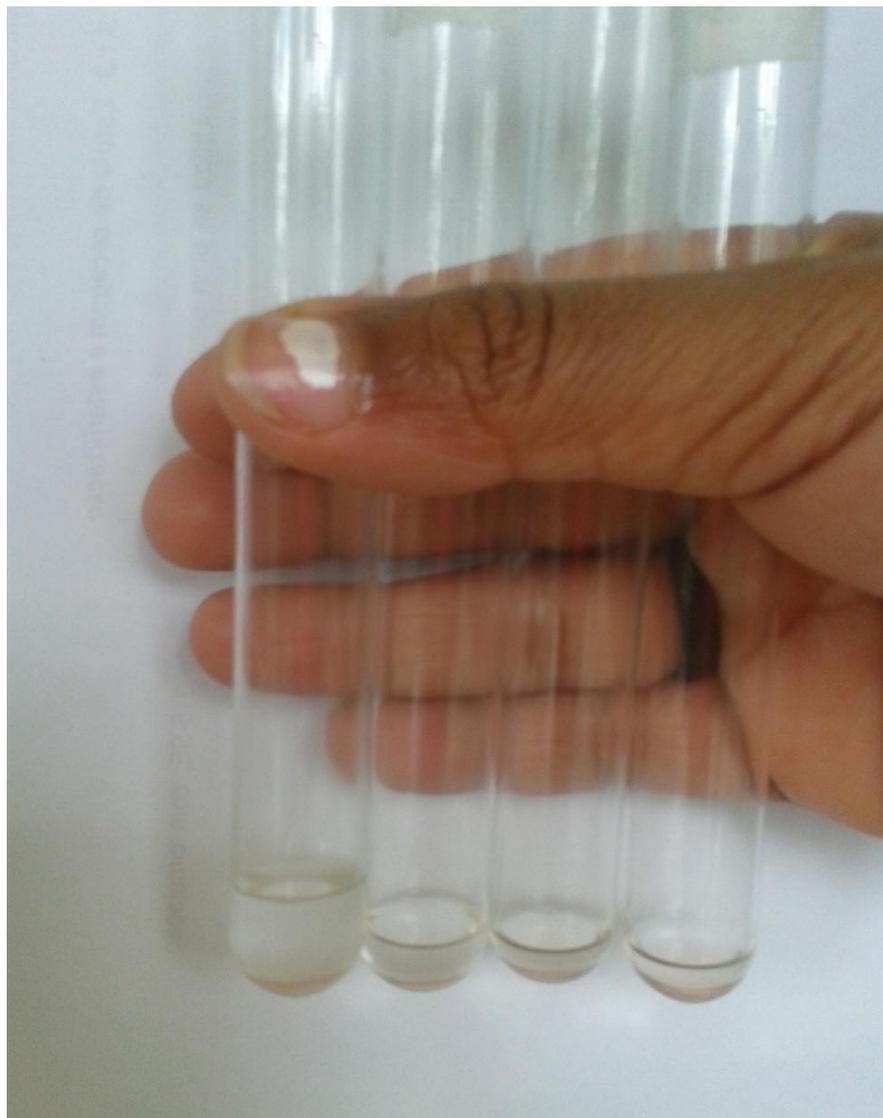
Figura 3 - Resultado para a reação de lugol.



Fonte: autora

Em relação à reação de Fiehe, 73,3% das amostras (11) apresentaram coloração de salmão a vermelho-cereja (Figura 4), ou seja, reação positiva para o teste, estando em desacordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2000). Tal resultado indica que estas podem ter sido submetidas a condições de superaquecimento, estocadas em temperatura elevada ou sofrido a adição de xaropes açucarados (CANO, 2005). Segundo LEAL et al. (2001), resultados positivos nesta reação podem indicar presença de HMF acima de 200 mg/kg.

Figura 4 - Resultado para a reação de Fiehe.



Fonte: autora

Resultados semelhantes foram encontrados por SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010), nos quais 75% das amostras apresentaram resultados positivos. No entanto PÉRICO et al. (2011) observaram que só 10% das amostras analisadas em seu estudo foram positivas

O superaquecimento pode ser utilizado quando há a tentativa de reaproveitar produtos que já estejam em início de fermentação, ou para facilitar o envase, para diminuir a cristalização e melhorar a aparência do produto para comercialização, ou ainda, quando não há controle de temperatura no transporte ou armazenamento destes produtos. Porém, cabe ressaltar que o aquecimento em temperaturas

próximas a da pasteurização ou maiores de méis é proibido pela legislação atual em relação ao mel de mesa (Brasil 2000).

Os resultados para a detecção e quantificação de bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e 45°C estão representados na Tabela 5.

4.1 Bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes

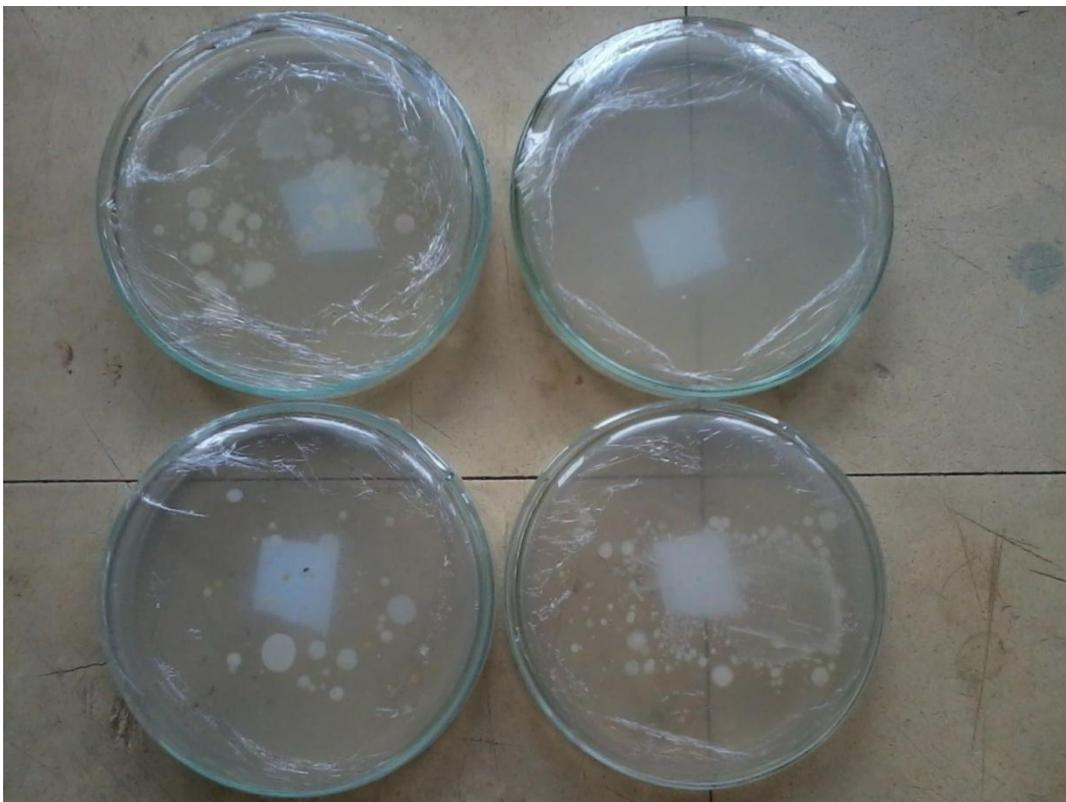
Tabela 6 - Parâmetros Microbiológicos de méis de abelhas *Apis mellifera* obtidos de apicultores autônomos e cooperativa no Estado de Alagoas.

Amostra	Bactérias aeróbias mesófilas	Bolores e leveduras	Coliformes a 35° C	Coliformes a 45° C
	UFC.g ⁻¹		NMP.g ⁻¹	
MM1	1,5x10 ⁷	-	0.20	0.15
MM2	-	-	0.16	0.09
MM3	-	-	>24.00	0.53
MM4	-	-	>24.00	0.44
MM5	-	2,2x10 ⁷	<0.03	<0.03
MC6	-	-	0.04	0.04
MC7	-	-	0.09	0.03
MC8	-	3,4x10 ⁷	0.04	0.07
MC9	-	-	<0.03	<0.03
MC10	7,4x10 ⁵	2,5x10 ⁷	>24.00	0.44
MC11	-	-	0.19	0.12
MC12	-	-	>24.00	0.75
MC13	4,2x10 ⁴	-	0.19	0.03
MC14	1,7x10 ⁶	-	>24.00	<0.03
MC15	-	-	0.03	0.06

De acordo com a tabela 6 quatro amostras, correspondendo a 26,6% do total, apresentaram contagem padrão de bactérias aeróbias mesófilas (Figura 5). Os valores máximos e mínimos foram verificados nas amostras MM1 e MC13, respectivamente, 1,5x10⁷ e 4,2x10⁴ UFC.g⁻¹. Os resultados da contagem dessas bactérias mostraram-se superiores aos valores encontrados por PIRES (2011); CARVALHO (2011) e SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010) e inferiores aos apresentados por MELO (2013). A contagem padrão tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, mostrando a limpeza, a desinfecção e o controle da sanidade do ambiente durante o processamento, transporte e

armazenamento, fornecendo também ideia sobre sua provável vida útil, que tem como ideal o consumo em até dois anos.

Figura 5 - Colônias de Bactérias Mesófilas isoladas em meio de Plate Cout Ágar



Fonte: autora

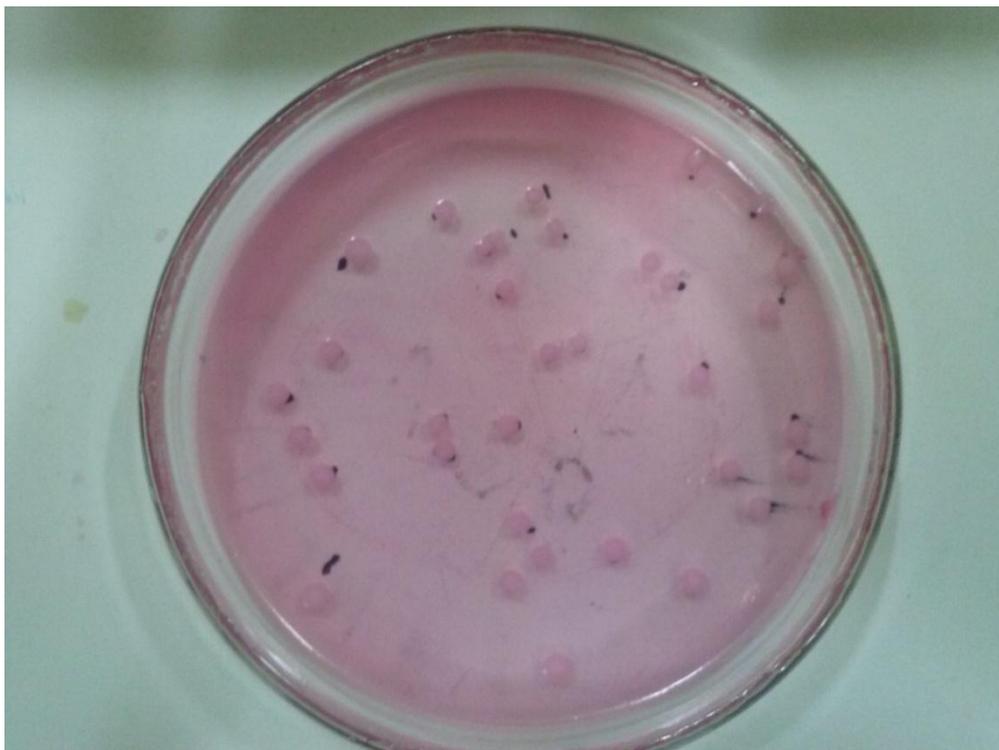
SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010) observaram baixas contagens de microrganismos aeróbios e mesófilos, os valores variaram entre $1,0 \times 10^1$ a $2,7 \times 10^2$, e atribuíram o fato de o mel ser um produto considerado antibacteriano, fato que está diretamente relacionado com a elevada pressão osmótica e baixa atividade da água (a_w) com valores de 0,5 a 0,6, deixando poucas moléculas de água livres para suportar o crescimento bacteriano; com a produção de peróxido de hidrogênio (pela ação da glucoseoxidase sobre a glucose); com a elevada acidez (inibindo o crescimento da maior parte dos microrganismos), com a viscosidade, que decresce rapidamente com o aumento de temperatura e com a presença de fitoquímicos (KUJAWSKI & NAMIÉSNIK, 2008).

PIRES (2011) quando analisou 54 amostras de mel, adquiridas diretamente das Cooperativas de Apicultores de três diferentes municípios de Piauí, verificou que para contagem de bactérias heterotróficas mesófilas, os valores em UFC.g^{-1} foram

de $1,0 \times 10^4$ e $5,0 \times 10^4$. CARVALHO (2011), analisou 205 amostras de méis (das quais 173 provenientes do estado do Rio de Janeiro e 32 amostras de outros estados), para detecção de bactérias mesófilas heterotróficas aeróbicas, obteve-se contagem média de $20,355 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ para os méis produzidos no Rio de Janeiro e média de $3,385 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ para os produzidos em outros estados brasileiros. O autor ressaltou ainda que levando em conta as características antimicrobianas inerentes ao mel, o resultado foi considerado alto. Contudo, o estudo realizado recentemente em Maceió por MELO (2013) revelou o valor máximo em contagem de $2,8 \times 10^9$ UFCg⁻¹.

Os resultados obtidos para contagem padrão de bolores e leveduras (Figura 6) mostraram que 20% das amostras apresentam valores acima do máximo estabelecido pelas normas brasileiras técnicas para alimentos, RDC 012 (ANVISA, 2001), sendo consideradas impróprias para o consumo humano direto. Os valores verificados nas amostras (MC5, MM8 e MM10) em que se observou contaminação foram $2,2 \times 10^7$, $3,4 \times 10^7$ e $2,5 \times 10^7$ UFC.g⁻¹. A contaminação no mel pode ocorrer de forma natural, em que fungos são trazidos à colmeia pelas abelhas ou pela ausência do uso das Boas Práticas Apícolas durante o manejo com as colmeias tais como: melhores condições higiênicas de equipamentos do pessoal responsável pelo manuseio do alimento, vale enfatizar a importância do monitoramento contínuo em todo o processamento e estocagem do mel, para garantir a comercialização de um alimento confiável (PIRES 2011). A presença de bolores e leveduras é geralmente aceita para todo mel, porém o maior problema relacionado é a fermentação do produto, resultando na hidrólise de açúcares com produção de álcool e gás carbônico, alterando o paladar e o aroma do mel (WHITE JÚNIOR, 1978).

Figura 6 - Colônias de Bolores e Leveduras isolados em meio de Martim.



Fonte: autora

MELO (2013), avaliando a qualidade microbiológica de 12 amostras de mel comercializado em Maceió, verificou em seis amostras (correspondendo a 50% do total analisado) uma contagem de bolores e leveduras acima do permitido pela legislação brasileira, com valores que variavam entre $4,4 \times 10^2$ a $1,43 \times 10^5$ UFC.g⁻¹.

SODRÉ et al (2007) quando analisaram 58 amostras de méis, dos Estados do Ceará e Piauí observaram contagem máxima para bolores e leveduras de $1,65 \times 10^4$ UFC g⁻¹ para o Ceará e de $3,0 \times 10^2$ UFC g⁻¹ para o Piauí. Valores esses bem abaixo dos encontrados no presente trabalho, porém também fora do padrão recomendado pelas leis vigentes.

Fungos filamentosos e leveduras são capazes de se desenvolverem em produtos com atividade aquosa baixa, se multiplicarem em uma ampla faixa de pH entre 2,0 e 8,5, tornando-se, desta forma, os principais deteriorantes de alimentos como o mel.

Com contagem de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, foi possível verificar que apenas 2 (13,3%) amostras apresentaram os resultados menores que 3,0 NMP.g⁻¹, ou seja, ausência em todas as amostras. A ausência desses microrganismos se deve a condições adequadas de higiene durante o

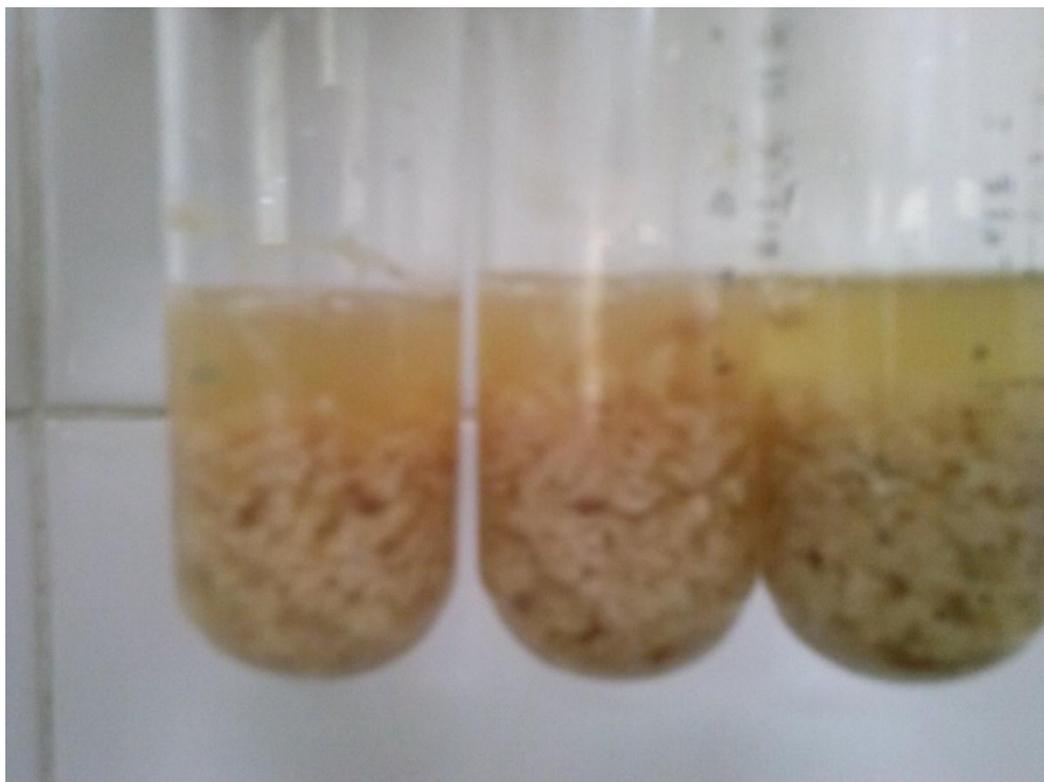
processamento do mel, garantindo a qualidade higiênico-sanitária deste produto (SILVA et al. 2008). Contudo, em grande parte das amostras 86,7% foi detectada um alto índice de contaminação, em quatro delas foram observadas presença de coliformes a 35°C em nível maior que 24,0 NMP.g⁻¹, resultado bem diferente daquele constatado por Souza et al. (2009), SODRÉ et al. (2007), SCHLABITZ; SILVA E SOUZA (2010) e PIRES (2011) no qual nenhuma das amostras mostrava-se contaminadas.

Os coliformes a 35°C e os bolores e leveduras são indicativos de higiene associada à manipulação, e os coliformes a 45°C avaliam as condições higiênico-sanitárias, podendo ser causadores de enfermidades (MURATORI & SOUZA, 2002).

4.2 Clostrídios sulfito redutores

Para a detecção de Clostrídios sulfito redutores nas amostras, foram realizadas análises em meio de Carne Cozida (Figura 7), após o período de incubação, 13 amostras foram descartadas por apresentarem resultados negativos, foram eles: MC1, MC2, MC3, MC5, MM6, MM7, MM8, MC10, MC11, MC12, MC13, MC14, MC15. As culturas em que foram observadas turbidez, produção de gás, digestão das partículas de carne no caldo representaram um total de 13,3% das amostras, essas foram submetidas ao método de Gram para detecção de bacilos Gram positivos esporulados ou não.

Figura 7 - Proteólise da carne e turbidez produzidas por bactérias em meio de Carne Cozida.



Fonte: autora

As duas amostras positivas foram coradas pelo método Gram, e detectada a presença de bacilos Gram positivos, em seguida foram transferidas para as placas de Petri contendo meio de AEY, com incubação em aerobiose e anaerobiose, sendo submetidas novamente à coloração de Gram, para confirmação dos bacilos Gram positivos. Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Confirmação de Bacilos Gram positivos das culturas em meio AEY.

Amostra	Anaerobiose	Aerobiose
MC4	+	+
MM9	+	+

Os resultados do presente estudo demonstraram a presença de bactérias esporuladas em 13,3% das amostras, identificadas a partir de um esfregaço esfregaço em lâmina e coradas pelo método de Gram, tanto em condições de aerobiose quanto de anaerobiose. Os resultados são preliminares, pois serão

realizadas provas bioquímicas objetivando-se a identificação de *Bacillus* spp, e provas bioquímicas e biológicas para a identificação de *C. botulinum*.

A incidência de bactérias esporuladas em mel tem sido estimada em diversos estudos RAGAZANI et al., 2008, quando analisaram 100 amostras de mel comercializados por ambulantes, mercados e feiras livres, em seis estados brasileiros detectaram a presença de bactérias esporuladas em 61% das amostras. SCHOCKEN-ITURRINO et al., (1999), analisando 85 amostras de mel, identificaram o crescimento bacteriano de *Clostridium* sp em 27,06% das amostras.

Estudo realizado por RALL et al. (2001) em amostras de mel comercializadas em São Paulo revelaram ausência de esporos de *Clostridium botulinum*. Porém em outro estudo também realizado por RALL et al. (2003), analisando 100 amostras de mel do Estado de São Paulo, foi relatado a presença de esporos de *C. botulinum* em três amostras.

O *Clostridium botulinum* é uma bactéria do tipo bacilar, reta ou semi-curva, Gram-positiva, esporulada, móvel, anaeróbia estrita e com atividade sulfito redutora que é comum no solo, no ar e nas águas ambientais, podendo ser encontrado em vários alimentos. Essa bactéria produz toxinas, que provocam distúrbios digestivos e neurológicos no paciente, a enfermidade é conhecida como botulismo, uma doença extremamente grave.

O consumo de mel contaminado por esta microbiota anaeróbica pode tornar-se um grande problema de saúde pública, por ser, o mel, um alimento de grandes propriedades nutricionais e farmacêuticas, altamente consumido pela população, principalmente idosos e crianças. Contudo, na presente investigação, os resultados obtidos, inclusive com a identificação de esporos deste patógeno, reforçam a importância deste achado para a saúde da população.

5 CONCLUSÃO

A qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* comercializado no Estado de Alagoas mostrou-se insatisfatória para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos avaliados.

De acordo com as análises físico-químicas, na procura por adulterantes, as amostras de mel, de maneira geral encontram-se fora dos padrões recomendados pela legislação brasileira.

Os méis apresentaram contaminação por bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras, coliformes a 35°C e 45°C, e indicativo da presença de clostridium.

Com os resultados obtidos é possível sugerir que podem ter ocorrido falhas em sua colheita, processamento, transporte e armazenamento, como a ocorrência de adulterações, falta de higiene durante o manejo, falta de limpeza dos materiais utilizados, armazenagem prolongada e ou inadequada.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A apicultura no Estado de Alagoas tem apresentado um aumento crescente, e o interesse dos consumidores por mel leva à valorização desta atividade, possibilitando a geração de emprego e renda. No entanto, é possível observar com este trabalho que há sérios problemas técnicos durante a produção do mel, sendo que devem acontecer vários ajustes em áreas específicas da atividade, mas basicamente devem interceder na questão do controle da qualidade do campo ao entreposto de mel.

Para o controle da qualidade da produção de mel é necessário o atendimento das normas das Boas Práticas Apícolas e empregar maior identificação do produto para diagnosticar as condições de produção de mel e a partir dos resultados, realizar a implantação de alterações no manejo, processamento, armazenamento e transporte, de modo que os apicultores consigam melhoria da qualidade do mel produzido e aumento da comercialização do produto.

As legislações vigentes, tanto a nacional quanto a internacional, não contemplam análises microbiológicas para o mel. A partir dos resultados obtidos com as análises microbiológicas, fica claro a necessidade de estabelecer um padrão microbiológico específico para o mel, já que se trata de um alimento amplamente consumido no Brasil e no mundo.

De acordo com resultados encontrados, é necessária a implantação de programas de controle de qualidade na cadeia de produção e beneficiamento do mel, direcionando atividades de apoio e desenvolvimento, orientando gestores públicos para planejamentos e ações que contribuam para realizar monitoramento da qualidade do produto, além de imprimir maior rigor na fiscalização, e de desenvolver novos padrões para análise microbiológica deste produto, visando garantir a saúde do consumidor, favorecendo a sua comercialização e exportação.

REFERÊNCIAS

ALCÁZAR, A.; JURADO, J.M.; PABLOS, F.A.; GONZÁLEZ, G.; MARTÍN, M.J. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in alcoholic beverages. *Microchemical Journal*, v 82, p.22-28, 2006.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alimentos: Determinação do número mais provável (NMP): MB-3463.** Rio de Janeiro, p.7, 1991.

ALMEIDA, D. A.S. **Avaliação de rainhas Africanizadas *Apis mellifera* selecionadas visando a produção de mel.** Dissertação (Mestrado Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2012.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001.** Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para os alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade do Crato, CE. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2006.

AROCHA E. M. M.; OLIVEIRA A. J. F.; NUNES, G. H. S.; MARACAJÁ P. B.; **Qualidade do mel de abelha produzidos pelos Incubados da iagram e comercializado no Município de Mossoró/RN.** *Caatinga*, Mossoró, v.21, n.1, p.211-217, janeiro/março de 2008. Disponível em: <<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema/article/viewFile/629/286>>. Acesso em: fevereiro de 2013.

BERTOLDI, F.C.; GONZAGA, L.; DONISETI, V.; REIS, A. **Características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), com florada predominante de hortelã-do-campo (*Hyptis crenata*), produzido no Pantanal.** In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAL E SÓCIO ECONÔMICO DO PANTANAL, 4, 2004, Corumbá (MS). Anais. Corumbá: [s.l.], 2004.

BERTOLDI, C. R. C. **Meliponicultura, uma alternativa sustentável.** Embrapa. Agosto de 2008. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/agosto/2asemana/meliponi-cultura-uma-alternativa-sustentavel>>. Acesso em: Dezembro de 2012.

BOGDANOV, S. **Contaminants of bee products.** *Apidologie*, v. 37, p. 1–18, 2006.

BOGDANOV, S. et al. **Honey quality and international regulatory standards: review by the international honey commission.** *Bee World*, v. 80, n. 2, p. 61-69, 1999.

BOGDANOV, S. **The Book of Honey:** physical properties of honey. *Bee Product Science*, chapter 4, January, 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria SIPA nº 006, de 25 de julho de 1985, Diário Oficial da União, 02 de agosto. de 1985, Seção 1, p. 11100.
BRASIL, Ministério da Agricultura, Portaria SIPA n. 367. Diário Oficial da União, 08 de setembro de 1997, seção1, p.19696.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Estabelece o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 out. 2000. Seção 1, p. 16-17.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, de 10 de janeiro de 2001, Seção 1, p. 45, 2001.

BRASIL. Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carne (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado do exercício de 2007. Instrução Normativa nº 9. Diário Oficial da União, 04 de abril de 2007, Seção 1, p. 7.

CAC. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Codex standard for honey.** Codex Stan 12–1981, 2. Revisions 1987 and 2001, p.1-8. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310>. Acesso em: 12 de Janeiro de 2013.

CAMPOS, R. G. M. **Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis.** Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra, Coimbra, v. 11, n. 2, p. 17-47, 1987.

CANO, C. B.; NAGATO, L. A. F.; DURAN, M. C. et al. **Açúcares e produtos correlatos.** In: INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. Brasília: ANVISA, Cap.7, p.321-343, 2005.

CARILLO MAGANA, F.A. **Meliponicultura: el mundo de las abejas nativas de Yucatán**. Mérida, México. 1998.

CARVALHO, B. O.; **Monitoramento de bactérias de importância para a saúde pública em méis comercializados no Estado do Rio de Janeiro e investigação dos pontos críticos da produção apícola**. 2011. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2011.

CRANE, E. Constituintes e característica do mel. In: CRANE, E. **O livro do Mel**. Tradução de Astrid Kleinert Giovane. São Paulo: Nobel, 1983.

EMBRAPA MEIO-NORTE. Embrapa Meio-Norte Sistema de Produção, 3. **Produção de mel**. Versão Eletrônica Jul/2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>, Acesso em: Janeiro de 2013.

EVANGELISTA-RIDRIGUES, A.; SILVA, E. M. S.; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. **Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba**. Ciência Rural, v. 35, n. 5, p. 1166-1171, 2005.

FERNÁNDEZ-TORREZ, R. **Mineral content and botanical origem of Spanish honeys**. Talanta, V.65, p. 686-691, 2005

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo. Atheneu, 2008.

FREITAS, B.M. **O uso de programas racionais de polinização em áreas agrícolas**. Mensagem doce. N.46, p.16-20, São Paulo: APACAME, 1998.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. v. 10. p. 920

GONÇALVES, L.S. 1994. **A influência do comportamento das abelhas africanizadas na produção, capacidade de defesa e resistência à doenças**. Anais do I Encontro Sobre Abelhas de Ribeirão Preto; p. 69-79.

GONÇALVES, L.S. 1996 **Abelhas africanizadas: Uma praga ou um benefício para a apicultura brasileira**. Anais do II Encontro sobre abelhas, Ribeirão Preto, SP, Brasil, pp. 165-170.
hexagon.net/files/file/fileE/Honey/4PhysicalPropertiesHoney.pdf>. Acesso em 24 de março de 2013.

HUCHET, E.; COUSTEL, J.G. **Les constituents chimiques du miel**. 2003
Disponível em: <http://www.Apiservices.com/articles/chimie_miel.htm>. Acesso em: 07 jul. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, volume 39, p. 1 - 63. 2011. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/ppm2011.pdf>>.
Acesso em 08 de maio de 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, edição IV, p. 330-332, 2008.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora Artmed, cap.24, p.491, 2005.

KERR, W.E. **The history of introduction of african bees to Brazil**. South African Bee Journal, v.39, n.2, p. 3-5, 1967.

KUJAWSKI, M.W., NAMIÉŚNIK, J. **Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues**. Trends in Analytical Chemistry, Vol.27, Nº9, 785-793. 2008

LEAL, V. M.; SILVA, M. H.; JESUS, N. M. **Aspecto físico-químico do mel de abelhas comercializado no município de Salvador- Bahia**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2001.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo. Savier, 2002, 975p.

LEGLER, Sergio. **Inspeção e controle da qualidade do mel**. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de zootecnia, 2001.
LOPES, M. T. R. As boas práticas na colheita e qualidade do mel. Embrapa. Janeiro de 2008. Disponível em: <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/artigos/2008/as-boas-praticas-na-colheita-e-qualidade-do-mel>.

LOUISE, J.K.; DURLING, L.F.B.; BJÖRN, E.H. **Evaluation of the DNA damaging effect of the heatinduced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases.** Food and Chemical Toxicology, v.47, p.880-884, 2009.

MARCHINI, L. C. **Caracterização de amostras de méis de *Apis mellífera* L., 1758 (Hymenoptera Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos.** 2001, 83f. Tese (Livre Docência), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2001.

MELO, LAÍS. M. **Qualidade Microbiológica de Méis de Abelhas Comercializados em Maceió.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2013.

MERCOSUL/GMC/RES no 15/94. **Regulamento Técnico MERCOSUL de identidade e Qualidade do Mel.** Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/PDF/GMC_RES_1994-15.pdf. Acesso em: outubro de 2012

MIDURA, T.F., SNOWDEN, S., WOOD, R.M., ARNON, S.S. **Isolation of *Clostridium botulinum* from honey,** Journal of Clinical Microbiology, vol. 9, N^o2, 282-283, 1979.

MURATORI, M. C. S. & SOUZA, D.C. **Características microbiológicas de 132 amostras de mel de abelhas do Piauí.** In: congresso brasileiro de apicultura, 14, Campo Grande, 2002. Anais, Campo Grande, 2002, p. 77.

PAULA NETO, F. L.; ALMEIDA N. R. M.; **Apicultura nordestina: principais mercados, riscos e oportunidades.** Série Documentos do ETENE, n. 12, 2006. 78p.

PEREIRA, F. M.; VILELA, S. L. O.; **Estudo da cadeia produtiva do mel no estado de Alagoas.** SEBRAE. 2003. 65p.

PÉRICO, E.; TIUMAN, T. S.; LAWICH, M. C.; KRUGER, R. L. **Avaliação Microbiológica e Físico-química de Méis Comercializados no Município de Toledo, PR.** Revista Ciências Exatas e Naturais, Guarapuava-Paraná, v.13, n.3, p.365-382, 2011.

PERUCA, R. D.; BRAIS, C. V.; OLIVEIRA, A. P. de; MUSSOLINE, V.; ALVES, J. A.; HORITA, S. F. **Projeto de fortalecimento da apicultura dos agricultores familiares no estado de Mato Grosso do Sul.** 13 p. 2002.

PEREZ, et al., **Mel: câmbio e embargo europeu podem prejudicar exportações em 2006**. São Paulo publicado em 17 de abril de 2006.

PIRES, R. M. C.; **Qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 produzido no Piauí**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) UFPI, 2011.

RAGAZANI, A. V. F.; Schoken-Iturrino, R. P.; Garcia, G. R.; Delfino, T. P. C.; Poiatti, M. L.; Berchielli, S. P. **Esporos de *Clostridium botulinum* em mel comercializado no Estado de São Paulo e em outros Estados brasileiros**. Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, p.396-399, 2008.

RALL, V. L. M. **Honey consumption in the state of São Paulo: a risk to human health?** Anaerobe, v.9, p.299-303, 2003.

RALL, V. L. M. **Incidência de esporos de *Clostridium botulinum* e análise da qualidade microbiológica do mel no estado de São Paulo**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21. 2001, Foz do Iguaçu, PR. Anais, Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001. p.403.

SANTOS, D.C.; MARTINS, J.N.; SILVA, K. F. N. L. **Aspectos físico-químicos e microbiológicos do mel comercializado na cidade de Tabuleiro do Norte-Ceará**. Revista Verde. 5(1): 79-85 (2010).

SCHLABITZ, C.; SILVA, S. A. F. da; SOUZA, C. F. V de. **Avaliação de Parâmetros físico-químicos e microbiológicos em mel**. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial, v. 04, n. 01, p. 80-90, 2010.

SCHOCKEN-ITURRINO, P.R.; CARNEIRO, M.C.; KATO, E.; SORBARA, J.O.B.; ROSSI, O D.; GERBASI, L.E.R. **Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil**. FEMS Immunology and Medical Microbiology, v.24, p.379-382, 1999.

SEBRAE. Boletim setorial do Agronegócio. **Apicultura**. Recife, Maio de 2011.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIREDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 8, n. 2-3, p. 260-265, 2004.

SILVA, M. B. L.; CHAVES, J. B. P.; MESSAGE, G.; GOMES, J. C.; OLIVEIRA, G. L. **Qualidade microbiológica de méis produzidos por pequenos apicultores e de**

méis de entrepostos registrados no Serviço de Inspeção Federal no Estado de Minas Gerais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n. 4, p. 417-420, 2008.

SILVA, R. A. da; RODRIGUES, L. M. de F. M.; LIMA, A. de; CAMARGO, R. da C. R. **Avaliação da qualidade do mel de abelha *Apis mellifera* produzido no município de Picos, Estado do Piauí, Brasil**. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 20, n. 144, p. 90- 94, set. 2006.

SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. **Microorganisms in honey Internacional**. Journal of Food Microbiology, v31, p.1-26, 1996.

SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C. ; MORETI, A. C. de C. C. ; ROSA, V. P. da; CARVALHO, C. A. L. . **Conteúdo microbiológico de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) dos Estados do Ceará e Piauí**. Boletim de Indústria Animal, v. 64, p. 39-42, 2007.

SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. . **Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) da Região Litoral Norte do Estado da Bahia**. Revista de Agricultura (Piracicaba), Piracicaba, v. 77, n.2, p. 243-256, 2002.

SOCHA, R., JUSZCZAK, L., PIETRZYK, S., FORTUNA, T. **Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys**, Food Chemistry, 113, 568-574. 2009.
SOUZA, D. C. A profissionalização da apicultura no Brasil. Revista Sebrae Agronegócios, n. 3, p. 50-51, 2006.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; DIAS, C. T. S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O. **Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 29, n. 4, p. 798-802, 2009.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington: American Public Health Association, p.1219, 1992.

VARGAS, Taís. **Avaliação da Qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais da Paraná**. 148f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa. 2006.

WHITE JUNIOR, J. W. **Methods for determining carbohydrates, hydroxymetilfurfural and proline in honey; collaborative study.** Journal of the Association of Official Analytical Chemists, v. 62, n. 3, p. 515-526, 1979.

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

WHITE JÚNIOR, J.W. 1994. **The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation.** American Bee Journal, v. 75, n. 3, p. 104-107.

WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. **Honey a comprehensive survey.** London: Heinemann, 1975. Cap. 6, p. 207-239.

WIESE, Helmut. Novo manual de apicultura. Guaíba: Livraria Editora Agropecuária, 1995. 292p.

WIESE, H. **Apicultura: Novos Tempos.** 1aEd. Guaíba-RS: Editora Agropecuária Ltda. 424p. 2000.

APÊNDICE

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

Água peptonada

Peptona de Carne 10,0g
Fosfato de sódio monobásico 9,0g
Fosfato de potássio dibásico 1,5g
Cloreto de sódio 5,0g
Água destilada 1000 ml

Lauril sulfato triptose

Peptona 20g
Lactose 5g
Potássio fosfato monobásico 2,75g
Potássio bibásico 2,75g
Cloreto de sódio 5g
Lauril sulfato de sódio 0,1g
Água destilada 1000ml

Caldo verde brilhante

Verde brilhante 0,4g
Água destilada 100 ml

Caldo EC (*Escherichia coli*)

Caldo EC 3,7g
Água destilada 100 ml

PCA

Triptona 5,0g
Extrato de levedura 2,5g
Dextrose 1,0g
Agar 15,0g
Água destilada 1000 ml

Meio de DRBC

Agar 18,5g

KH_2PO_4 1,0g

Peptonaa 5,0g

$\text{K}_2\text{4PO}_4$ 0,5g

$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,5g

Dextrose 10,0g

Rosa bengala 0,033g

Extrato de levedura 0,5g

Água destilada 1000ml

Meio de CMM

Meio de carne cozida 12,5g

Água destilada 100ml

Meio de AEY

Caseína 5,0g

Peptona 20,0g 37

Extrato de levedura 5,0g

Cloreto de sódio 5,0g

Ágar 15,0g

Emulsão de ovo 80 mL

Água destilada 1000 mL

Coloração pelo Método Gram

Cristal de violeta 1 minuto

Lugol 1 minuto

Descolorante 1 minuto

Safranina 30 segundos