



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MEL

Adriana de Jesus Inácio Belas

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira

São Braz

CO-ORIENTADORA

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM MEL

Adriana de Jesus Inácio Belas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira São Braz

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira

São Braz

O-ORIENTADORA

Dra. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

2012

LISBOA

À minha filha e ao meu marido.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

À Professora Doutora Berta São Braz, pela sua disponibilidade na orientação deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, amizade, confiança e incentivo constante, à Dra. Belmira Carrapiço, por toda a atenção, amizade, enriquecimento pessoal e profissional.

Resumo - Resíduos de Medicamentos Veterinários em Mel

O mel é o produto da apicultura mais conhecido e comercializado no mundo, que tem vindo a ser considerado como natural, saudável, sendo consumido pela maioria das pessoas, especialmente crianças e pessoas doentes, devido aos seus efeitos benéficos.

Na Apicultura, o uso de antibióticos e de acaricidas sintéticos é uma prática corrente, para o tratamento de doenças bacterianas e parasitárias das abelhas, e da qual pode resultar a presença de resíduos dessas substâncias no mel. Estes resíduos podem comprometer a qualidade do produto e a segurança alimentar, causando problemas comerciais e de saúde pública.

Com este trabalho pretendeu-se desenvolver metodologias analíticas específicas, sensíveis, rápidas e relativamente baratas para determinação de cumafos, flumetrina, tau-fluvalinato, tetraciclina e sulfamidas em mel e a determinação dessas mesmas substâncias em amostras comerciais de mel, para avaliação do produto em termos de segurança para o consumidor. O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

As metodologias analíticas desenvolvidas incluem uma fase inicial de extracção em fase sólida, seguida de análise por cromatografia de camada fina utilizando diferentes sistemas de eluição e reagentes de visualização para cada grupo químico e também a cromatografia gasosa com detector de captura electrónica, no caso dos acaricidas.

As metodologias implementadas para rastreio de acaricidas e antibióticos apresentaram sensibilidade acima de 90% e especificidade de 100%, à excepção das sulfamidas em que se obteve sensibilidade a partir de 77%. Assim, o procedimento analítico proposto pode ser utilizado para rastreio de resíduos de substâncias farmacologicamente activas de medicamentos veterinários, em mel.

Nas 42 amostras de mel nacional, recolhidas durante o período de Outubro de 2010 a Junho de 2011, foi identificado o sulfatiazol em 9,7% das mesmas, que constituirá uma utilização ilegal uma vez que de acordo com a Legislação Europeia não está autorizado a utilização de antibióticos na produção de mel. As restantes substâncias não foram detectadas nas amostras analisadas.

A avaliação da presença de resíduos de substâncias farmacologicamente activas no mel realizada neste trabalho mostra que estas substâncias não representam um risco elevado em termos de segurança alimentar.

Palavras-chave: mel, acaricidas, antibióticos, metodologias analíticas, segurança alimentar.

Abstract – Veterinary Medicine Residues in honey

Honey is the best known product of beekeeping, marketed worldwide, that has always been regarded as natural and healthy. Most people, especially children and sick people, consume it because of its beneficial effects. The use of antibiotics and synthetic acaricides (as Veterinary Medicine Products- VMPs) in beekeeping is a common practice for the treatment of bees bacterial and parasitic diseases, which can result in the presence of residues in honey. These residues can compromise product quality and food safety, causing commercial problems and public health concerns.

The aim of this work was the development of specific, sensitive, rapid and relatively inexpensive analytical methods to determine coumaphos, flumethrin, tau-fluvalinate, tetracyclines and sulphonamides in honey and make their determination in commercial samples to evaluate the consumers safety. This work was developed in Pharmacology and Toxicology Laboratory of Veterinary Medicine Faculty, Technical University of Lisbon.

Analytical methodologies developed include solid phase extraction and thin layer chromatography analysis, using different elution systems and visualization reagents for each chemical group. For acaricides gas chromatography with electron capture detector was used.

The implemented methodologies for acaricides and antibiotics screening showed over 90% of sensitivity and 100 % of specificity, except for the sulfonamides (sensitivity of 77%).

These methodologies allows the use of this proposed analytical procedure on screening of pharmacologically active substances residues of VMPs in honey.

42 national honey samples were collected during the period October 2010 to June 2011 and analysed.

In 9.7% of the samples sulfatiozol was detected, which will constitute an illegal use, since according to European legislation, antibiotics use is not allowed in honey production. No other substances were detected in the samples.

The evaluation of the presence of pharmacologically active substances residues of VMPs in honey carried out in this work shows that these substances do not pose a high risk in terms of food safety.

Keywords: honey, acaricides, antibiotics, analytical methodologies, food safety.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo - Resíduos de Medicamentos Veterinários em Mel.....	iii
Abstract – Veterinary Medicine Residues in honey	v
Índice	vii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
Capítulo I: Introdução.....	1
1.1 - Definição, caracterização e composição química do mel	1
1.2 - Sector Apícola.....	3
1.3 - Estrutura do Sector Apícola	5
1.4 - Produção Nacional de Mel	7
1.5 - Consumo de Mel em Portugal e Mercado Nacional de Mel	10
1.6 - Comercialização de Mel.....	11
1.7 - Doenças das abelhas.....	12
1.8 - Medicamentos Veterinários na Apicultura.....	13
1.9 - Resíduos de substâncias farmacologicamente activas	15
1.9.1 - Antibióticos	15
1.9.2 - Acaricidas Sintéticos	16
1.10 - Aspectos regulamentares de substâncias farmacologicamente activas em mel	17
1.11 - Monitorização de resíduos no mel	20
1.11.1 - Plano Nacional de Controlo de Resíduos.....	20
1.11.2 - Resultados de não conformidades entre 2006 – 2009 em Portugal e na União Europeia	22
1.11.3 - Estudos de pesquisa de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel na União Europeia	23
1.12 - Sistema de Alerta Rápido para os géneros alimentícios e alimentos para animais da União Europeia - Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF).....	26
1.13 - Métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em mel	28
1.13.1 – Amostragem analítica.....	28
1.13.2 - Preparação da Amostra Analítica – Técnicas de Extracção, Purificação e Concentração	28
1.13.3 - Métodos de rastreio para substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares.....	29
1.13.3.1 -Teste Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	30
1.13.3.2 - Teste Charm II.....	30
1.13.3.3 - Cromatografia de Camada Fina <i>vs</i> Cromatografia de Camada Fina de Alta Resolução	31
1.13.4 - Determinação substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares	33
1.13.4.1 - Cromatografia Gasosa.....	34
1.13.4.2 - Cromatografia Líquida de Alta Resolução.....	34
1.13.5 - Confirmação de substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares... ..	35
1.14 - Validação de Métodos Cromatográficos	38
1.14.1 - Validação de Métodos de Rastreio.....	38
1.14.2 - Validação de métodos de confirmação (quantitativos)	40
Capítulo II – Desenvolvimento Experimental.....	43

2.1 - Objectivos do trabalho	43
2.2 - Desenho experimental	43
2.2.1 - Desenvolvimento laboratorial das metodologias de análise para rastreio dos resíduos de substâncias farmacologicamente activas em mel	43
2.2.1.A - Desenvolvimento e optimização da metodologia analítica para rastreio de acaricidas (cumafos, fluvalinato e flumetrina) em mel	43
A.1 - Material e Métodos	43
A.1.1 - Reagentes	43
A.1.2 - Equipamentos	44
A.1.3 - Procedimento Experimental	44
A.1.3.1 - Detecção/identificação de acaricidas por Cromatografia de Camada Fina	44
A.1.3.2 - Amostras	45
A.1.3.3 - Preparação das amostras	45
A.1.3.4 - Avaliação da eficiência do método analítico para rastreio de acaricidas em amostras de mel	45
A.1.3.5 - Detecção/identificação de acaricidas por Cromatografia Gasosa	45
A.1.4 - Análise Estatística	46
2.2.1.B - Desenvolvimento e optimização da metodologia analítica para rastreio de Tetraciclinas e Sulfamidas em mel	46
B.1 - Material e Métodos	46
B.1.1 - Reagentes	46
B.1.2 - Equipamentos	46
B.1.3 - Procedimento experimental	47
B.1.3.1 - Detecção/identificação de Tetraciclinas e Sulfamidas por Cromatografia de Camada Fina	47
B.1.3.2 - Amostras	48
B.1.3.3 - Preparação das amostras	48
B.1.3.4 - Avaliação da eficiência do método analítico para rastreio de antibióticos em amostras de mel	48
B.1.4 - Análise Estatística	48
2.2.2 - Determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional	49
2.2.2.1 - Amostras	49
2.2.2.2 - Determinação de acaricidas e antibióticos em amostras de mel	49
2.2.2.2.1 - Procedimento Experimental	49
Capítulo III - Resultados e Discussão	51
3.1 - Detecção/identificação de Acaricidas sintéticos por Cromatografia de Camada Fina	51
3.2 - Desenvolvimento da Técnica de Extração em Fase Sólida com detecção/identificação por Cromatografia de Camada Fina	53
3.3 - Detecção e Identificação dos acaricidas estudados por Cromatografia Gasosa	54
3.4 - Detecção/identificação de Tetraciclinas e Sulfamidas por Cromatografia de Camada Fina	55
3.5 - Desenvolvimento da Técnica de Extração em Fase Sólida com detecção/identificação por Cromatografia de Camada Fina	60
3.6 - Determinação de resíduos de acaricidas sintéticos e antibióticos em amostras de mel	61
Capítulo IV - Conclusão	65
Bibliografia	67

Anexo I – Poster apresentado no 5 °Congresso de Ciências Veterinárias, 13-15 de Outubro de 2011, Santarém. 79

Índice de Figuras

Figura 1: Representação gráfica da distribuição de apicultores registados (frequência relativa) por zona geográfica	6
Figura 2: Representação gráfica da distribuição do número de colónias (frequência relativa), por zona geográfica.	7
Figura 3: Representação da distribuição geográfica de produção mel com denominação de origem protegida.....	9
Figura 4: Estruturas químicas de alguns antibióticos.....	15
Figura 5: Estruturas químicas de vários acaricidas.....	17
Figura 6: Principais notificações referentes à presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos alimentares, de 2005 a 2009.....	27
Figura 7: Representação de cromatograma obtido por Cromatografia de Camada Fina e determinação do factor de retenção.	32
Figura 8: Tina de Cromatografia convencional (a) e Equipamento de cromatografia de camada fina de alta resolução (b).....	33
Figura 9: Visualização a 254/366 nm das manchas correspondentes para os acaricidas estudados.	51
Figura 10: Colorações das manchas das substâncias estudadas, após pulverização com os reagentes dicloreto de paládio, p-anisaldeído e INT/PMS.....	52
Figura 11: Perfil cromatográfico para amostra de mel considerada como branco.....	54
Figura 12: Perfil cromatográfico para o composto o cumafos.	54
Figura 13: Perfil cromatográfico para o composto flumetrina.	55
Figura 14: Perfil cromatográfico o composto tau-fluvalinato.....	55
Figura 15: Migração da tetraciclina e oxitetraciclina com a combinação ácido cítrico (10%) / n-hexano/ etanol (80:10:10, v/v/v).	57
Figura 16: Migração da tetraciclina e oxitetraciclina após pré-tratamento da placa com EDTA 0,27 M pH 9, fase móvel: clorofórmio/ metanol/ EDTA 5% (65:20:5, v/v/v).	57
Figura 17: Visualização a 254/366 nm das manchas correspondentes para as tetraciclina e sulfamidas estudadas.....	58
Figura 18: Colorações obtidas após pulverização com o reagente p-anisaldeído, fluorescamina, iodo 1% em etanol e ácido sulfúrico 16%.....	59
Figura 19: Representação gráfica da presença de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional (n=42).....	62

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição qualitativa do mel -----	2
Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e valores máximos e mínimos permitidos pela legislação em vigor -----	3
Tabela 3: Acções de ajuda ao sector apícola -----	4
Tabela 4: Distribuição regional (valor absoluto e relativo) de apicultores registados e número de colónias -----	6
Tabela 5: Evolução da produção nacional de mel entre 1997 e 2010 -----	8
Tabela 6: Produção de mel com denominação de origem protegida entre 2006 e 2007 -----	8
Tabela 7: Modo de Produção Biológico. Evolução Nacional de 2005 a 2008 -----	10
Tabela 8: Consumo anual (t) e per capita (kg/hab) de Mel em Portugal -----	10
Tabela 9: Doenças das abelhas de declaração obrigatória -----	12
Tabela 10: Resultados laboratoriais positivos às doenças endémicas das abelhas -----	13
Tabela 11: Lista de substâncias activas utilizadas em alguns países a nível mundial -----	14
Tabela 12: Lista de produtos usados na apicultura e respectiva IDA (mg/kg peso corporal) -----	19
Tabela 13: Número de amostras colhidas e de amostras com resultados não conformes para o mel, registados no PNCR, entre 2006 e 2009 -----	22
Tabela 14: Número de amostras colhidas e de amostras com resultados não conformes obtidos pela Comunidade Europeia, desde 2006 até 2009. -----	23
Tabela 15: Resíduos de acaricidas sintéticos em mel em diferentes países da União Europeia. --	24
Tabela 16: Resíduos de antibióticos identificados no mel em diferentes países da União Europeia. -----	25
Tabela 17: Número de notificações referentes quanto ao mel/geleia real e à presença de resíduos de medicamentos veterinários, desde de 2005 a 2010 -----	27
Tabela 18: Metodologias analíticas para pesquisa de acaricidas em mel -----	36
Tabela 19: Metodologias Analíticas para pesquisa de Antibióticos em diferentes produtos alimentares. -----	37
Tabela 20: Determinação de avaliação da eficiência de um método. -----	39
Tabela 21: Amostras recolhidas pelas diferentes regiões de Portugal. -----	49
Tabela 22: Estatística descritiva dos valores de Rf (média, desvio padrão e coeficiente de variação) para cada acaricida sintético estudado ($n=9$). -----	51
Tabela 23: Parâmetros de identificação dos acaricidas sintéticos estudados em mel. -----	53
Tabela 24: Parâmetros de validação do método para rastreio de Cumafos, Flumetrina e Tau-fluvalinato em mel. -----	53
Tabela 25: Estatística descritiva dos valores de Rf (média, desvio padrão e coeficiente de variação) para cada antibiótico nos diferentes sistemas de eluição ($n=9$) -----	56
Tabela 26: Parâmetros de identificação dos antibióticos estudados. -----	60
Tabela 27: Parâmetros de validação do método para rastreio de tetraciclina e sulfamidas em mel. -----	61
Tabela 28: Determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional ($n=42$). -----	62

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Designação
AFN	Autoridade Florestal Nacional
ASAE	Autoridade da Segurança Alimentar e Económica
BSE	Encefalopatia espongiforme bovina
C18	Coluna com enchimento C18
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CG	Cromatografia Gasosa
CL	Cromatografia Líquida
CLAR	Cromatografia Líquida de Alta Resolução
CLUR	Cromatografia Líquida de Ultra Resolução
CV%	Coeficiente de Variação percentual
DCE	Detector de Captura Electrónica
DGSANCO	Direcção Geral de Saúde na União Europeia
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DIC	Detector de Ionização de Chama
DOP	Denominação de origem protegida
DOP	Denominação de Origem Protegida
DP	Desvio padrão
DRACA	Direcção Regional de Assuntos Comunitários da Agricultura
DRADR	Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural
DRAP	Direcção Regional de Agricultura e Pescas
DRDA	Direcção Regional de Desenvolvimento Agrário da Região Autónoma dos Açores
DRP%	Desvio padrão relativo percentual
DSHPV	Direcção de Serviços de Higiene Pública Veterinária
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELL	Extracção Líquido-Líquido
EFS	Extracção em Fase sólida
EFSA	European Food Safety Authority/ Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

EM	Espectrometria de Massa
EMA	European Medicines Agency/ Agência Europeia de Medicamentos
EMEA	European Agency for Evaluation of Medical Products/ Agência Europeia de Avaliação de Medicamentos
EPA	United States Environmental Protection Agency/ Agência de Protecção Ambiental
FDA	United States Food and Drug Administration/ Administração de Alimentos e Medicamento
FNAP	Federação Nacional de Apicultores de Portugal
GAPA	Grupo de Acompanhamento de Programa Apícola
GPP	Gabinete de Planeamento e Políticas
HMF	Hidroximetilfurfural
HPTLC	Cromatografia de Camada Fina de Alta Resolução
ICH	International Conference on Harmonisation
IDA	Ingestão Diária Admissível
INT	Cloreto de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazólio
IFAP	Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas
INE	Instituto Nacional de Estatística
INE	Instituto nacional de Estatística
INRB	Instituto Nacional dos Recursos Biológicos
INSA	Instituto Nacional Dr. Ricardo Jorge
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Limite de Detecção
LMR	Limite Máximo de Residuo
LQ	Limite de Quantificação
MADRP	Ministério da Agricultura, desenvolvimento rural e pescas
MADRP	Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas
MEFS	Microextracção em Fase Sólida
MEID	Ministério da Economia da Inovação e Desenvolvimento
NOEL	Efeito não observável
PAN	Programa Apícola Nacional
PIF	Postos de Inspeção Fronteiriços

PMS	Metassulfato de fenazina
PNCR	Plano Nacional de Controlo de Resíduos
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed/ Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais
USP	United States Pharmacopeia
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

Capítulo I: Introdução

A Segurança Alimentar é um tema cada vez mais relevante face ao aumento da procura por uma melhor qualidade de vida e consciencialização dos consumidores quanto ao direito de adquirir produtos seguros para a saúde.

A noção de pureza e inocuidade caracterizou o mercado do mel durante muitos anos, contudo após os vários eventos de contaminação de alimentos, como, cloranfenicol e nitrofuranos no camarão, dioxinas em carne de frango e porco, a crise da encefalopatia espongiforme bovina (BSE), a crise da febre aftosa, entre outros, aumentou a atenção dos consumidores e apicultores para o tema da segurança do mel. Inicialmente a atenção em termos de segurança alimentar no mel estava focada para a poluição ambiental (metais pesados) e no problema causado pelo uso de pesticidas na agricultura. Subsequentemente ao aparecimento da crise da varroose na Europa e a necessidade de tratamentos repetidos com acaricidas tornou fundamental o controlo destas substâncias nos produtos apícolas. Por último o interesse dos apicultores e dos consumidores foi direccionado para a presença de resíduos de antibióticos no mel. Inicialmente, estes resíduos eram associados ao mel produzido em países terceiros, contudo o aumento da intensificação dos controlos oficiais e o desenvolvimento e aperfeiçoamento das metodologias analíticas, permitiu concluir que a presença de antibióticos no mel acontecia também no mel produzido na Europa (Piro & Mutinelli, 2003).

O presente trabalho, desenvolvido no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, foi realizado no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período de Outubro de 2010 a Novembro de 2011.

Os objectivos do trabalho consistiram no desenvolvimento de metodologias para rastreio de medicamentos veterinários em amostras de mel, dado que a nível nacional a oferta deste tipo de análises é praticamente nula, e posterior determinação dessas mesmas substâncias em amostras comerciais de mel provenientes de diferentes regiões de Portugal, para avaliação do produto em termos de segurança para o consumidor.

1.1 - Definição, caracterização e composição química do mel

O mel é um produto biológico muito complexo que sempre foi considerado como natural, saudável, sendo o produto da apicultura mais conhecido e comercializado no mundo. É apreciado pelo seu sabor característico, pelo seu valor nutritivo e também devido a um maior interesse em

produtos naturais e saudáveis por parte do consumidor. É usado como adoçante, sendo normalmente consumido pela maioria das pessoas, especialmente crianças e pessoas doentes, devido aos seus efeitos benéficos.

De acordo com o Decreto-lei nº 214/2003 de 18 de Setembro de 2003, o mel é “*uma substância açucarada natural produzida pelas abelhas da espécie Apis mellifera a partir do néctar de plantas ou das secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insectos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia*”.

O mel pode ser classificado de acordo com a sua origem (mel de néctar e de mel de melada), modo de produção (centrifugado, escorrido, prensado e filtrado), apresentação (favos, pedaços de favos e cristalizado) ou uso (consumo e industrial) (DL nº 214/2003).

Na tabela seguinte pode observar-se a composição do mel, considerando que este é um alimento constituído essencialmente por açúcares, nomeadamente glicose e frutose, água e outros componentes, nomeadamente enzimas, ácidos orgânicos, sais minerais e vitaminas (DL nº 214/2003, INSA, 2006).

Tabela 1: Composição qualitativa do mel (adaptado de Tabela da Composição de Alimentos, INSA, 2006; DL nº 214/2003).

Parâmetro	Quantidade (por 100g)
Energia (Kcal)	309,0
Água (g)	18,5
Proteína (g)	0,50
Total Hidratos de Carbono disponíveis (g)	78,0
Total HC expresso monossacáridos (g)	81,9
Mono + dissacáridos (g)	78,0
Tiamina (mg)	0,010
Riboflavina (mg)	0,040
Equivalentes de niacina (mg)	0,30
Vitamina B6 (mg)	0,20
Cinza (g)	0,16
Sódio (mg)	12,0
Potássio (mg)	51,0
Fósforo (mg)	10,0
Magnésio (mg)	2,00
Ferro (mg)	0,40
Zinco (mg)	0,90
Cor	Incolor -castanho escuro

As análises físico-químicas que, de acordo com Decreto-lei nº 214/2003 devem ser realizadas para o controle de qualidade do mel incluem os seguintes parâmetros: teor de água, hidroximetilfurfural (HMF), açúcares redutores, sacarose, acidez, sólidos insolúveis em água, índices diastásico e condutividade eléctrica. O teor de água é um dos principais parâmetros de análise da qualidade do mel, não sendo tolerado valores acima de 20%, dado que alguns microrganismos têm capacidade de se desenvolverem nestas condições. O hidroximetilfurfural (HMF) é um parâmetro indicador de qualidade que permite a identificação de um produto fresco (HMF em baixas concentrações), ou que tenha sido aquecido, armazenado em condições inadequadas ou adulterado com xarope de açúcar invertido (HMF em elevadas concentrações). Na Tabela 2 podem ser observados os valores mínimos e máximos que devem ser respeitados para os parâmetros físico-químicos de qualidade do mel.

Tabela 2: Parâmetros físico-químicos e valores máximos e mínimos permitidos pela legislação em vigor (adaptado de DL nº 214/2003).

Parâmetro	Mel de Néctar	Mel de Melada
Teor de açúcares (Frutose e Glicose)	Mínimo 60 g/100 g	Mínimo 45 g/100 g
Teor de sacarose	Em geral 5 g/100 g	
Teor em água	Em geral máximo 20 %	
Teor de matérias insolúveis na água	Em geral máximo 0.1 g/100 g	
Condutividade eléctrica	Em geral 0.8 mS/cm	
Ácidos livres	50 meq/1000 g	
Índice diastásico (escala de <i>schade</i>)	Em geral no mínimo 8	
HMF	Máximo de 40 mg/kg	

1.2 - Sector Apícola

Segundo o Regulamento (CE) nº 797/2004 do Conselho de 26 de Abril de 2004 “*A apicultura é um sector da agricultura cujas principais funções consistem na actividade económica e no desenvolvimento rural, na produção de mel e de outros produtos apícolas e na contribuição para o equilíbrio ecológico.*”

A apicultura é caracterizada pelas diferentes condições de produção, pela dispersão e heterogeneidade dos agentes económicos aos níveis da produção e comercialização. Assim foi necessário implementar programas nacionais trienais que incluíssem-se acções de assistência técnica, combate à varrose, racionalização da transumância, gestão de repovoamento do efectivo

apícola e colaboração em programas de investigação e estudos estatísticos sobre a estrutura do sector apícola (produção, comercialização e preços) (Regulamento (CE) nº 797/2004).

No âmbito do Regulamento (CE) nº 797/2004 do Conselho, de 26 de Abril, relativo a acções de melhoria das condições de produção e comercialização de produtos da apicultura, e do Regulamento (CE) nº 917/2004 da Comissão, de 29 de Abril, que estabelece as respectivas normas de execução, foi aprovado o Programa Apícola Nacional (PAN) para o triénio de 2005 a 2007, através da Decisão da Comissão C (2004) 3181, de 25 de Agosto de 2004.

O Despacho Normativo nº 30/2005, de 6 de Maio, estabeleceu algumas regras complementares de aplicação do programa, tendo em vista a sua execução no triénio de 2005 a 2007 e a definição do regime que discipline o seu desenvolvimento para além desse período.

Em 2008 pelo Despacho nº 23/2008 de 18 de Abril foram estabelecidas regras complementares de aplicação em relação ao PAN anterior, as principais alterações devem-se ao facto de que os apicultores profissionais passaram a ser beneficiários directos do programa (comercialização e distribuição de medicamentos) e as organizações de apicultores passaram a estabelecer planos sanitários.

Para o triénio de 2011 - 2013, a Decisão da Comissão C (2010) 6102 final, de 14 de Setembro de 2010, aprovou um novo programa apícola nacional relativamente ao qual se tornou necessário estabelecer as respectivas regras de aplicação. De modo a alcançar uma maior eficácia na execução do novo programa e a contribuir para a melhoria da produção e comercialização dos produtos da apicultura através da profissionalização do sector e de incentivos à concentração da oferta, surge o Despacho Normativo nº 27/2010 de 24 de Novembro e a principal alteração em relação ao anterior é a luta integrada contra a varroose (Tabela 3).

O acompanhamento e a execução do PAN são da competência do Grupo de Acompanhamento do Programa Apícola (GAPA), entidade de natureza consultiva, composto por representantes das seguintes entidades: GPP (Gabinete de Planeamento e Políticas), que preside; IFAP (Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas); cada uma das DRAP (Direcções Regionais de Agricultura e Pescas); DRACA (Direcção Regional de Assuntos Comunitários da Agricultura); DRADR (Direcção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural); DGV (Direcção - Geral de Veterinária); AFN (Autoridade Florestal Nacional); INRB (Instituto Nacional dos Recursos Biológicos); FNAP (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal); DRDA (Direcção Regional de Desenvolvimento Agrário da Região Autónoma dos Açores).

Tabela 3: Acções de ajuda ao sector apícola (adaptado de IFAP, 2011).

ACÇÕES	MEDIDAS
Acção n.º 1 - Assistência Técnica	1A - Apoio à Divulgação 1B - Serviços de Assistência Técnica 1C - Melhoria das Condições de Processamento 1D - Assistência Técnica em Qualidade e Segurança Alimentar 1E - Rastreabilidade Apícola
Acção n.º 2 - Luta contra a Varroose	2A - Luta Integrada Contra a Varroose 2B - Rastreio Nacional à Varroose
Acção n.º 3 - Transumância	3A - Aquisição de Equipamento de Transumância
Acção n.º 4 - Análises Laboratoriais	4A - Apoio à Realização de Análises Laboratoriais
Acção n.º 5 - Repovoamento do Efectivo Apícola	5A - Apoio à Criação de Rainhas 5B - Apoio à Aquisição de Rainhas
Acção n.º 6 - Programas de Investigação Aplicada	6A - Apoio a Projectos de Investigação Aplicada

1.3 - Estrutura do Sector Apícola

A apicultura é uma actividade largamente desenvolvida na União Europeia, tanto a nível profissional (apicultores com mais de 150 colmeias), como a nível de lazer.

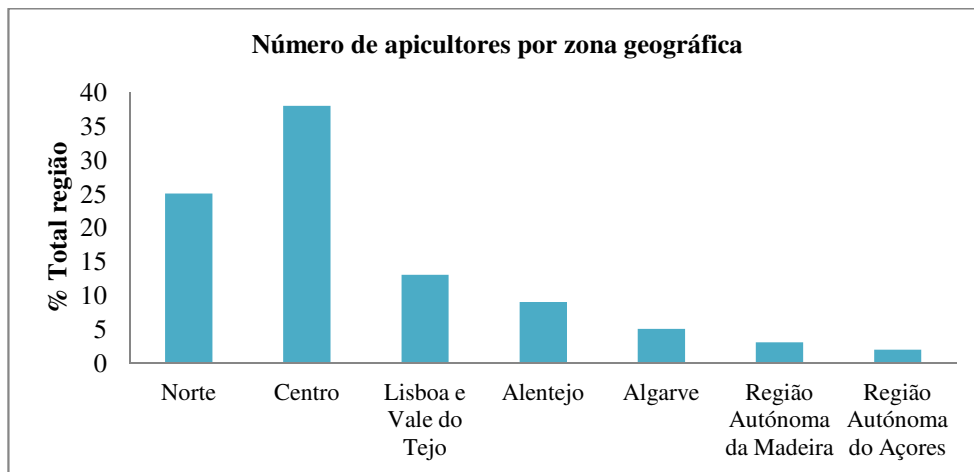
Em Portugal, em 2010, existiam 17 291 apicultores registados, com um universo de 38 203 apiários e 562 557 colónias. A dimensão média das explorações apícolas, em Portugal é de 32,5 colónias e/ou cortiços por apicultor. Os apicultores não profissionais, representam 96,6% do total de apicultores e detêm 61,8% do total de colónias, com dimensão média de 21 colónias por apicultor. Os apicultores profissionais, representam apenas 3,4% do total de apicultores (apenas 594 apicultores) e, em contrapartida, detêm 38,2% do efectivo total, com dimensão média de 361 colónias por apicultor (PAN 2011 - 2013, 2010).

Na Tabela 4 e na Figura 1 pode observar-se a distribuição geográfica dos apicultores portugueses registados. Verifica-se que a maior percentagem de apicultores registados se situa na zona Centro (38%), seguida da região Norte (25%) e da região de Lisboa e Vale do Tejo (13%). As restantes regiões registam valores inferiores a 10%.

Tabela 4: Distribuição regional (valor absoluto e relativo) de apicultores registados e número de colónias (adaptado de PAN 2011 - 2013, 2010).

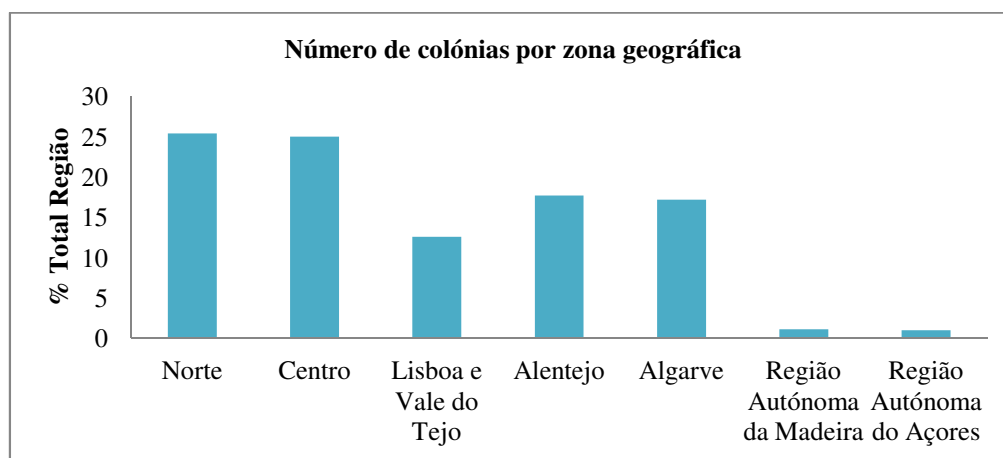
	Apicultores		Colónias	
	Valor absoluto	% Total Região	Valor absoluto	% Total Região
Norte	4854	25,00	142628	25,4
Centro	6684	38,00	140579	25,0
Lisboa e Vale do Tejo	2306	13,00	70973	12,6
Alentejo	1666	9,00	99652	17,7
Algarve	893	5,00	96925	17,2
Região Autónoma da Madeira	553	3,00	618	1,1
Região Autónoma do Açores	335	1,94	5682	1,0
Total	17291	100	562557	100

Figura 1: Representação gráfica da distribuição de apicultores registados (frequência relativa) por zona geográfica (adaptado de PAN 2011 - 2013, 2010).



Na figura 2 pode observar-se que nas regiões Norte e Centro o número de colónias é idêntico (25%), o mesmo acontecendo nas regiões de Alentejo e Algarve (aproximadamente 17%).

Figura 2: Representação gráfica da distribuição do número de colónias (frequência relativa), por zona geográfica (adaptado de PAN 2011 - 2013, 2010).



1.4 - Produção Nacional de Mel

Dos diversos produtos apícolas alimentares, o mel é o mais valorizado pelos apicultores nacionais, tendo como principal destino a alimentação (consumo directo) a indústria alimentar e ainda residualmente, em diversas indústrias não alimentares.

Na Tabela 5 é apresentada a evolução da produção nacional de mel entre 1997 e 2008. Entre 1997 e 2002 observa-se um crescimento significativo, contudo entre 2002 e 2005 verifica-se um decréscimo na produção de mel, sendo no entanto de assinalar que o acentuado decréscimo ficou-se a dever às condições de seca excepcionais que ocorreram. Entre 2007 e 2009 a situação estabilizou, verificando-se um aumento ligeiro em 2010 (PAN 2008 - 2010, 2007; PAN 2011 - 2013, 2010; Passão, 2010; INE, 2011c,d,e).

Tabela 5: Evolução da produção nacional de mel entre 1997 e 2010 (adaptado de PAN 2008 - 2010, 2007, INE, 2009, PAN 2011 -2013, 2010, INE, 2010, INE, 2011 c, d, e).

Ano	Produção Nacional de Mel (t)
1997	3,690
1999	4,465
2001	7,379
2002	7,861
2003	7,310
2004	6,737
2005	5,686
2006	5,978
2007	6,907
2008	6,654
2009	6,919
2010	7,426

Em relação à produção de mel, a nível regional não existem dados oficiais do Instituto Nacional de Estatística (INE), nem do Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas (MADRP), apenas existem dados do INE relativos à produção nacional de mel e alguns dados do Gabinete de Planeamento e Políticas do MADRP relativos à produção de mel certificada com Denominação de Origem Protegida (DOP) (Tabela 6), que relativamente a cada área geográfica delimitada com DOP não correspondem à produção total de mel dessa área, dado que, nem todo o mel produzido é certificado com DOP.

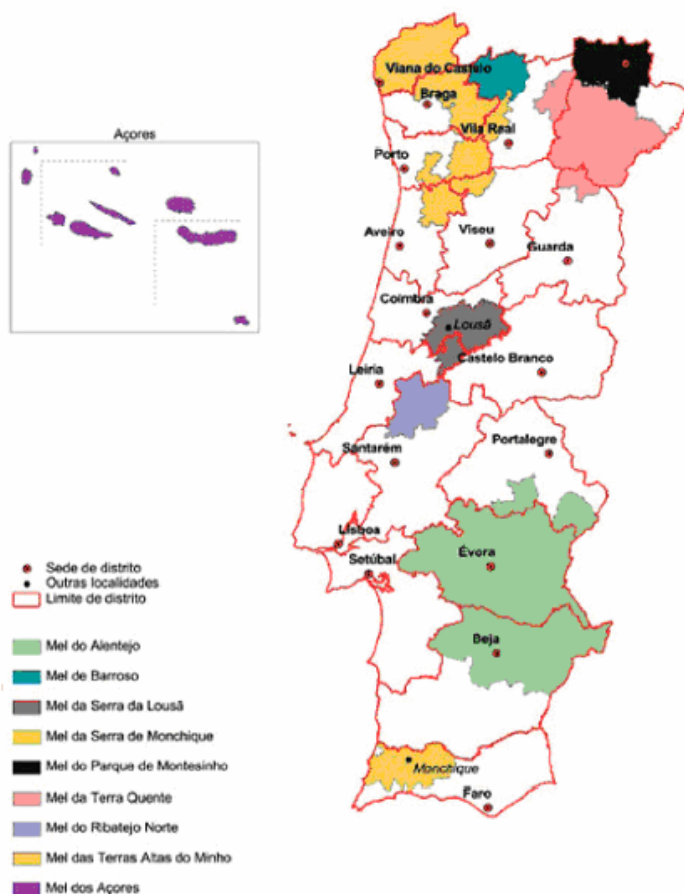
Tabela 6: Produção de mel com denominação de origem protegida entre 2006 e 2007 (adaptado de PAN 2011 – 2013, 2010).

Produto	Produção (kg)	
	2006	2007
Mel da Serra da Lousã	40000	30000
Mel da Terra Quente	3404	4706
Mel das Terras Altas do Minho	6200	7147
Mel de Barroso	57000	65000
Mel do Parque de Montesinho	36186	59232
Mel dos Açores	3000	3000
Total	145790	169085

Da análise dos dados disponíveis em relação à produção de mel com DOP (2006 e 2007) verifica-se um crescimento, contudo no contexto global da produção nacional de mel representa apenas 2,4% (2007) (PAN 2011 – 2013, 2010).

No nosso país existem nove regiões com denominações de origem protegida para a produção de mel (Figura 3). O mel varia de região para região em consonância com a flora, dando-lhe características específicas que possibilitam a sua tipificação em função da origem ou tipo floral, valorizando-o comercialmente. O mel é obtido de acordo com as regras de produção, extracção, embalagem e conservação do produto, demonstrando o interesse dos produtores em apostar na qualidade. As regiões geográficas são: Terras Altas do Minho; Terra Quente; Montesinho; Barroso; Serra da Lousã; Ribatejo Norte; Alentejo; Serra de Monchique e Açores (PAN 2008 - 2010, 2007; PAN 2011 -2013, 2010; Passão, 2010).

Figura 3: Representação da distribuição geográfica de produção mel com denominação de origem protegida (adaptado de PAN 2011 -2013, 2010).



A nível nacional a prática da apicultura em modo de produção biológico é ainda escassa. Os dados disponíveis indicam no entanto um significativo aumento deste modo de produção (Tabela 7).

Tabela 7: Modo de Produção Biológico. Evolução Nacional de 2005 a 2008 (adaptado de INE, 2009, 2010).

Número de colmeias				Produtores			
2005	2006	2007	2008	2005	2006	2007	2008
1439	1499	3608	6122	19	19	40	47

1.5 - Consumo de Mel em Portugal e Mercado Nacional de Mel

O consumo de mel *per capita* destinado à alimentação é inferior a 1 kg por habitante (cerca de 700 gramas/habitante/ano) (Tabela 8) (PAN 2011-2013).

Tabela 8: Consumo anual (t) e *per capita* (kg/hab) de Mel em Portugal (adaptado de PAN 2011 -2013, 2010; INE, 2011a,b).

Período de referência dos dados	Consumo anual de mel (t)	Consumo <i>per capita</i> (kg/hab) de mel
2009/2010	7	0,70
2008/2009	7	0,70
2007/2008	8	0,80
2006/2007	6	0,60
2005/2006	6	0,60

Abreviaturas: t- milhares

Estudos desenvolvidos pela Federação Nacional de Apicultores de Portugal (FNAP), sobre o consumo de mel em Portugal permitiram concluir que os consumidores portugueses adquirem o mel junto a produtores da região, à exceção dos consumidores da região de Lisboa. Contrariamente à maioria dos produtos alimentares, as marcas de mel não são preferência, basta o mel ser de origem nacional. As características de um mel com qualidade para os consumidores portugueses são sobretudo a textura, o paladar, a cor e a origem do mel (PAN 2011-2013, 2010).

1.6 - Comercialização de Mel

A comercialização de mel têm vindo a alterar-se muito devido à legislação de controlo de segurança alimentar, que nas últimas duas décadas tem vindo a ser implementada na União Europeia.

De acordo com o Decreto-lei nº 1/2007 de 2 de Janeiro de 2007, que estabelece as condições de funcionamento dos locais de extracção e processamento do mel e outros produtos da apicultura destinados ao consumo humano, complementar aos Regulamento (CE) nº 852/2004 e 853/2004, ambos de 29 de Abril, o mel ou outros produtos apícolas destinados ao consumo humano *"só podem ser comercializados se forem provenientes de unidades de produção primária ou estabelecimentos aprovados"*. Os pequenos e médios apicultores que tradicionalmente forneciam, directamente através das suas unidades de produção primária, mel a granel a pequenas indústrias alimentares, estão impossibilitados de o fazer, uma vez que o fornecimento de mel à indústria alimentar, como matéria-prima, só poderá ser autorizado, se este for proveniente de um estabelecimento com licença de exploração industrial para extracção e/ou acondicionamento de mel. As unidades de produção primária têm de estar registadas na Direcção - Geral de Veterinária (DGV), às quais é atribuído um número de registo. Estas unidades e os estabelecimentos que procedem à extracção ou processamento do mel e outros produtos apícolas, devem cumprir os requisitos de instalação, funcionamento e licenciamento descritos no anexo I do Regulamento (CE) nº 852/2004. Por outro lado a comercialização de mel pré-embalado, pelos apicultores nas suas unidades de produção primária, está restringida à comercialização directa ao consumidor final ou a estabelecimentos de comércio retalhista, na quantidade de 500 kg/ano e à área geográfica do distrito de implantação da unidade, devendo a restante produção ser comercializada a granel e exclusivamente a estabelecimentos que procedem à extracção ou processamento do mel e outros produtos apícolas (Decreto-lei nº 1/2007; Portaria 699/2008, PAN 2011-2013, 2010).

A comercialização de mel a granel para um estabelecimento deve implicar a realização de análises de despiste de contaminantes no mel e o conhecimento, no estabelecimento de destino, das condições de higiene e segurança alimentar da unidade de produção primária ou estabelecimento de origem, permitindo assim, juntamente com a aplicação de boas práticas de higiene em toda a cadeia de produção, fornecer ao consumidor um produto de confiança.

A comercialização do mel ao consumidor, implica ainda o cumprimento do exposto no Decreto-lei nº 560/99 de 18 de Dezembro de 1999, em termos de rotulagem, apresentação e publicidade e

obedecer também ao disposto no Decreto-lei nº 214/2003 referente ao mel e que transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva nº 2001/110/CE, do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001.

1.7 - Doenças das abelhas

As abelhas podem ser afectadas por várias doenças quer bacterianas, quer virais e mesmo parasitárias (Tabela 9).

Tabela 9: Doenças das abelhas de declaração obrigatória (adaptado de DL nº 203/2005; DGV, 2011).

Denominação	Agente	Tipo de Agente	População atingida
Loque americana	<i>Paenibacillus larvae</i>	Bactéria	Criação
Loque Europeia	<i>Melissococcus pluton</i>	Bactéria	Criação
Varroose	<i>Varroa destructor</i>	Ácaro	Criação e abelhas adultas
Ascose	<i>Ascophaera</i> spp	Fungo	Criação
Acarapiose	<i>Acarapis woodi</i>	Ácaro	Abelhas adultas
Aethinose*	<i>Aethina tumida</i>	Coleóptero	Criação e abelhas adultas
Nosemose	<i>Nosema</i> spp	Protozoário	Abelhas adultas
Tropilaelaps*	<i>Tropilaelaps</i> spp	Ácaro	Criação e abelhas adultas

Legenda: * Ausente de Portugal

De acordo com o Decreto-lei nº 203/2005, de 25 de Novembro de 2005, o exercício da actividade apícola carece de registo prévio na Direcção - Geral de Veterinária e é obrigatório a declaração anual de existências. A Direcção - Geral de Veterinária, elabora anualmente um Programa Sanitário Apícola, visando o estabelecimento das medidas de sanidade veterinária para defesa do território nacional das doenças das abelhas, bem como dos requisitos a que devem obedecer as Zonas Controladas¹. A introdução, em Zonas Controladas, de abelhas, enxames, colónias ou colmeias e seus produtos, bem como substâncias, materiais ou utensílios destinados à apicultura necessitam de prévia autorização da DGV (DGV, 2011).

¹ Zonas em que a ausência da doença não foi demonstrada, nas quais se procede ao controlo sistemático das doenças das abelhas, levadas a efeito por uma entidade gestora, reconhecida pela Direcção-Geral de Veterinária.

Na Tabela 10 são indicados os resultados laboratoriais quanto à presença de doenças endémicas das abelhas, estando confirmado que no nosso país, estão presentes as doenças, Varroose, Loque Americana, Acarapise, Ascosferiose e Nosemode, de forma endémica.

Tabela 10: Resultados laboratoriais positivos às doenças endémicas das abelhas (adaptado de PSA, 2011).

Ano	Amostras testadas	Varrose	Loque americana	Acarapise	Ascosferiose	Nosemose
2005	197	80	20	-----	-----	-----
2006	1251	195	15	-----	-----	-----
2007	524	294	40	10	-----	-----
2008	1555	855	73	27	180	-----
2009	2757	722	34	30	27	143

Legenda: ----- sem dados disponíveis, mas doença presente.

Os resultados disponíveis indicam que em 2008, 54,98 % dos apiários estavam infectados com o ácaro Varroa, continuando a ser a doença com maior prevalência no território nacional em 2009 (26,19%). Este aumento aparente de resultados positivos a partir de 2006, deve-se essencialmente, ao acréscimo das análises realizadas (PSA, 2011).

1.8 - Medicamentos Veterinários na Apicultura

Os medicamentos veterinários devem ser usados no tratamento da doença e não como prevenção da mesma. Para esta é recomendado, uma alimentação adequada das abelhas, a manutenção das colmeias, incluindo práticas de higiene adequadas e verificações regulares de saúde das colmeias. Para evitar a presença de substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares apícolas, apenas devem ser utilizados os medicamentos veterinários autorizados pelas autoridades competentes (Direcção-Geral de Veterinária, em Portugal) para uso em abelhas. O uso de medicamentos veterinários não é recomendado durante a colheita do mel, mas se tal acontecer este não deve ser utilizado para consumo humano (FAO/WHO, 2010).

Existem vários Medicamentos de Uso Veterinário autorizados para o tratamento das doenças das abelhas, entre eles antibióticos, acaricidas sintéticos e orgânicos. Na Tabela 11 estão indicadas as substâncias activas autorizadas a nível mundial, incluindo Portugal. A nível nacional as substâncias farmacologicamente activas autorizadas, como medicamentos veterinários em

Apicultura são o cumafos, a flumetrina, o tau-fluvalinato, o amitraz e o timol (acaricida orgânico) (FAO/WHO, 2010).

Tabela 11: Lista de substâncias activas utilizadas em alguns países a nível mundial (adaptado de FAO/WHO, 2010).

País	Substância Activa							
	Cumafos	Tau-fluvalinato/ Fluvalinato	Flumetrina	Amitraz	Timol	Outros Compostos Orgânicos	Oxitetraciclina	Outros
Argentina	•		•	•	•	•	•	•
Armenia				•			•	
Austria	•	•						•
Austrália			•		•		•	•
Alemanha	•	•	•		•	•		
Áustria	•	•			•			
Bélgica	•				•			
Bulgária	•	•	•		•	•		
Canadá							•	•
Chipre	•	•		•	•	•		
Eslováquia		•	•	•	•	•	•	
Eslovénia	•		•		•			
Espanha		•	•	•	•	•		
Estados Unidos da América							•	•
Estónia		•	•		•			
França		•		•	•	•		
Dinamarca					•			
Grécia	•	•	•		•	•		
Holanda		•			•			
Hungria	•		•		•	•		•
Irlanda			•		•			
Itália	•	•		•	•			
Japão		•		•				•
Letónia		•	•			•		
Lituânia		•	•			•		
Malta			•					
Polónia			•	•	•	•		
Portugal	•	•	•	•	•	•		
República Checa		•		•	•	•		•
Reino Unido		•	•		•	•		•
Roménia	•	•		•				
Suíça	•		•		•	•		

Legenda: • autorizado

1.9 - Resíduos de substâncias farmacologicamente activas

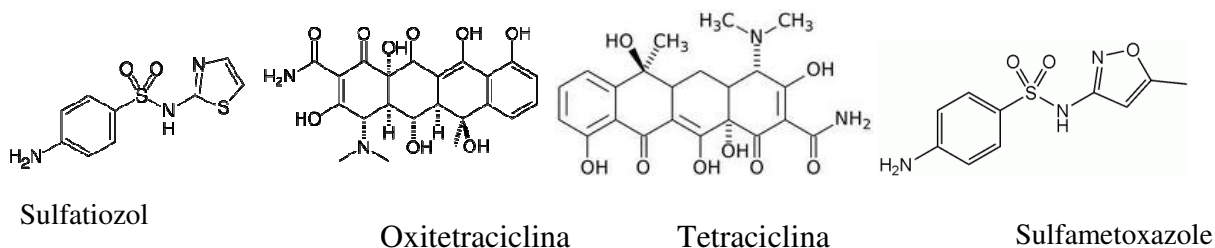
1.9.1 - Antibióticos

Na Apicultura, o uso de antibióticos é uma prática corrente para o tratamento de doenças bacterianas, como a Loque Americana e a Loque Europeia. A presença de resíduos de antibióticos em produtos alimentares representa um perigo potencial para a saúde dos consumidores, devido à ocorrência de reacções alérgicas, do choque anafilático em indivíduos susceptíveis, de modificações na flora intestinal, do desenvolvimento de resistências bacterianas e, posteriormente, a transferência de multi-resistência entre as bactérias através de plasmídios (Gunes, Gunes & Cibik, 2009). A oxitetraciclina foi dos primeiros antibióticos a ser utilizado para controlar a loque Americana e Europeia, contudo outros antibióticos, como as sulfonamidas, macrólidos (tilosina), estreptomicina, e cloranfenicol são também utilizados (Bogdanov, 2006; Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González & Frenich, 2009).

De acordo com Maia (2008), em Portugal, os antibióticos mais utilizados na Apicultura são a oxitetraciclina e o sulfatiazol para o combate à Loque Americana e Europeia, apesar de estas substâncias activas não estarem autorizadas a nível nacional.

Algumas sulfamidas são consideradas carcinogénicas, e existe mesmo suspeita de causarem anemia aplásica. Este facto tem sido debatido nos últimos anos em termos de segurança alimentar. Como resultado, a presença de resíduos de sulfamidas em alimentos é considerada prejudicial para os consumidores (Reybroek, 2003; Maudens, Zhang & Lambert, 2004; Krivohlavek, Smit, Bastinac, Zuntar & Plavsic, 2005; Wang, Zhang, Wang, Duan & Kennedy, 2006; Maia, 2008).

Figura 4: Estruturas químicas de alguns antibióticos (Fonte: Chemicalbook, 2011).



1.9.2 - Acaricidas Sintéticos

Os Acaricidas são aplicados na agricultura, como produtos fitofarmacêuticos, contra pragas, e na apicultura para controlar o ácaro *Varroa destructor*.

A maioria destes pesticidas de uso generalizado, actua por contacto directo e são de fácil aplicação, não requerendo conhecimentos específicos sobre a biologia das abelhas.

Um dos inconvenientes destes compostos é a sua persistência, pois são compostos lipossolúveis e acumulam-se, após tratamento repetido, nos produtos apícolas, principalmente na cera. Assim, apesar de estas substâncias ajudarem a controlar as infecções parasitárias, têm originado o aparecimento de resíduos nos produtos apícolas, incluindo no mel, comprometendo a qualidade do produto e a segurança alimentar, causando problemas comerciais, de saúde pública e de resistência do parasita a algumas das moléculas utilizadas (Jansson, 2000; Korta, Bakkali, Berrueta, Gallo, Vicente & Bogdanov, 2003; Bogdanov, 2006; Zhou, Xue, Zhang, Chen & Zhao, 2007; Hong, Jung, Ryoo & Hong, 2009; Ryoo *et al*, 2009, Adamczyk, Lázaro, Pérez-Arquilué, Bayarri & Herrera, 2010).

Neste grupo encontram-se todos os acaricidas de síntese, utilizados para controlar a população de varroa, entre eles contam-se o cumafos, o fluvalinato, a flumetrina, o amitraz, o bromopropilato, e o malatião (Albero, Sanchez-Brunete, & Tadeo, 2001; Zhou *et al.*, 2007; Adamczyk *et al.*, 2010).

O cumafos pertence à família dos organofosforados insecticida-acaricida. Actua a nível das sinapses colinérgicas do sistema nervoso central por inibição das colinesterases. A aplicação do cumafos foi permitida na apicultura para o controle de ácaros e pequenos besouros existentes nas colmeias, contudo os resíduos são um grande problema, uma vez que a molécula é lipossolúvel e não volátil, podendo ocorrer migração da cera para o mel e possível acumulação de resíduos neste último (EMEA, 2001).

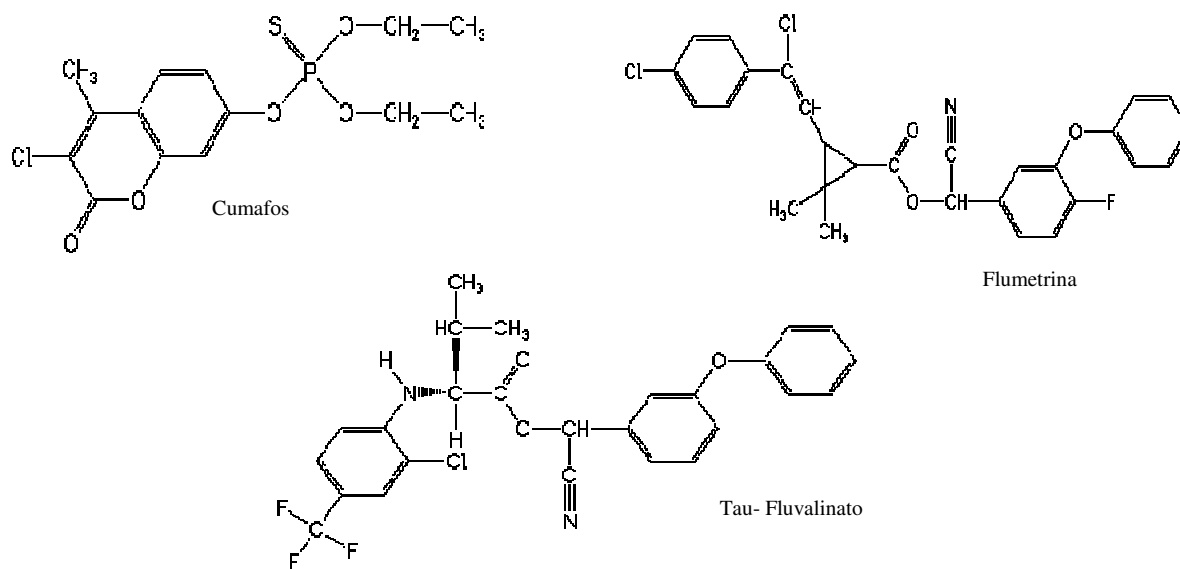
A flumetrina é um piretróide lipossolúvel, de 3ª geração, utilizado no controlo de ectoparasitas em bovinos, ovinos, caprinos, cavalos e cães, e comercializada para o diagnóstico e controlo da varroose em colmeias. O uso de flumetrina dentro das colmeias implica a contaminação directa do mel, podendo causar danos prejudiciais em termos de saúde pública, uma vez que pode induzir danos cromossomicos nas células da médula óssea (EMEA, 1998; Zhou *et al.*, 2007).

O tau-fluvalinato é um piretróide sintético, desenvolvido originalmente para controlo de ácaros em plantas ornamentais e que mais tarde se mostrou eficiente no controlo da *Varroa destructor*. Esta substância combina a alta eficácia com o respeito pela maioria dos artrópodes, pelo que se

pode aplicar em qualquer momento, incluindo a floração, tendo reduzida toxicidade sobre abelhas (EMEA, 1995). Entre os acaricidas utilizados na apicultura o tau-fluvalinato é considerado o mais lipofílico, propriedade que combinada com a elevada estabilidade na cera contribui para o aumento da concentração dos resíduos nos favos de mel (Tsigouri, Menkissoglu-Spiroud, Thrasyvoulou & Diamantidis, 2004).

Nos últimos anos têm-se verificado uma diminuição do uso do tau-fluvalinato e da flumetrina (ambos piretróides) na apicultura, devido ao desenvolvimento de resistência do acário da varroa a estas substâncias químicas, pelo efeito de pressão selectiva sobre as populações do acário. Face a este facto, os apicultores começaram a aplicar o cumafos, contudo já existem relatos da resistência do ácaro a esta substância na União Europeia e nos Estados Unidos da América (Thompson, Ball, Brown & Bew, 2003; Maggi, Ruffinengo, Damiani, Sardella & Eguaras, 2009).

Figura 5: Estruturas químicas de vários acaricidas (Fonte: Chemicalbook, 2011).



1.10 - Aspectos regulamentares de substâncias farmacologicamente activas em mel

Para protecção do consumidor, a legislação comunitária exige que seja feita uma avaliação de segurança do medicamento veterinário, antes da sua introdução no mercado, dado que só podem ser autorizados em condições que garantam a protecção do animal e do consumidor.

A Directiva 2001/82/CE, de 6 de Novembro de 2001, que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários, alterada pela Directiva 2004/28/CE, de 31 de Março de 2004, pelo Regulamento (CE) n° 470/2009 e pelo Regulamento (CE) n° 37/2010, prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, vindo assim implementar na União Europeia procedimentos para avaliação de segurança.

De acordo com os padrões definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumidor padrão (indivíduo adulto com 60 kg de peso) deve ingerir diariamente uma quantidade de alimentos. De modo a avaliar o risco causado pela exposição a uma substância, as agências reguladoras, requerem testes específicos para efectuar essa avaliação. Esta avaliação engloba os riscos toxicológicos, o risco ambiental, os efeitos microbiológicos e farmacológicos dos resíduos das substâncias farmacologicamente activas presentes nos medicamentos veterinários. A avaliação dos riscos fármaco-toxicológicos é realizada em animais de laboratório, para determinação da ingestão diária admissível – IDA ² e do nível máximo de uma substância a que os animais de laboratório podem ser expostos sem que sejam observados quaisquer efeitos deletérios (Efeito não observável - NOEL)³.

Após esta avaliação, estabelecem-se então os limites máximos de resíduos (LMRs)⁴ ou determina-se a proibição do uso da substância (Directiva 2004/28/CE, de 31 Março, Regulamento 470/2009, de 6 de Maio). A classificação, respeitante aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, encontra-se estabelecida no Regulamento (CE) n° 37/2010 da Comissão de 22 de Dezembro de 2009. As substâncias serão incluídas no quadro I quando é permitida a sua utilização na composição de medicamentos veterinários e no quadro II quando são proibidas, sendo que estas são assim classificadas porque apresentam risco não aceitável para a saúde pública.

² Ingestão diária admissível, estimativa da substância e/ou seus resíduos expressa em µg ou mg por quilograma de peso corporal, que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida sem nenhum risco de saúde apreciável para os indivíduos expostos.

³ “Todas as substâncias farmacologicamente activas, expressas em mg/kg ou ug/Kg de peso fresco, quer sejam substâncias activas, exceptos produtos de degradação, e os seus metabolitos, que permanecem nos géneros alimentícios” (Regulamento 470/2009)

⁴ Concentração máxima de resíduos resultante da utilização de um medicamento veterinário (expresso em mg/kg ou ug/kg de peso fresco) que a Comunidade pode aceitar como legalmente autorizada ou que é reconhecida como aceitável à superfície ou no interior de um alimento (Regulamento (CE) 2377/90).

Tabela 12: Lista de produtos usados na apicultura e respectiva IDA (mg/kg peso corporal) (adaptado de FAO/WHO, 2009; EMEA, 2001; EMEA, 1995)

Substância	IDA (mg/kg peso corporal)
Amitraz [*]	0-0,01
Bromopropilato [*]	0-0,03
Clorotetraciclina [*]	0-0,003
Cumafos ^{**}	0,00025
Flumetrina [*]	0-0,004
Ácido fórmico ^{a*}	0-3
Mentol ^{a*}	0-4
Oxitetraciclina [*]	0-0,003
Sulfatiazol [*]	Sem IDA atribuído
Tau-fluvalinato ^{**}	0-0,0005
Timol ^{a*}	Aceitável

Legenda: * JECFA; ** EMA, a- Produto considerado seguro em termos de segurança alimentar;

De acordo com o Regulamento nº 37/2010, relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal, não existem limites máximos de resíduos definidos para antibióticos no mel. Assim, na União Europeia não está autorizado o uso de antibióticos na apicultura, uma vez que não existem medicamentos autorizados para uso na apicultura. Alguns países, tais como Suíça, Inglaterra e Bélgica, estabeleceram para estas substâncias, limites de acção que variam entre 0,01 a 0,05 mg/kg para cada grupo de antibiótico (Maudens *et al.*, 2004).

A presença de resíduos de antibióticos no mel não é aceitável na Europa para produtos importados de países terceiros. No caso de um produto apícola estar contaminado com antibióticos, implica a destruição do produto e a penalização do produtor. Assim, assume-se que estas substâncias não podem estar presentes no mel. De acordo com Debayle, Dessalces & Grenier-Loustalot (2008), Maia, (2008) e Vidal *et al.* (2009) aplica-se uma política de “tolerância zero” para a presença de antibióticos no mel, sendo esta política generalizada, uma vez que tem como base a prevenção da contaminação deste alimento por estas substâncias, e está dependente das metodologias analíticas disponíveis, utilizadas para identificação e determinação destas mesmas substâncias. O conceito de “tolerância zero” aplica-se essencialmente a substâncias

identificadas e com suspeita de possuírem propriedades carcinogénicas ou mutagénicas (Regulamento (CE) nº 37/2010).

Nos Estados Unidos, Canada e Argentina são utilizados antibióticos para controlo da loque, contudo, várias estirpes de *P. larvae* têm vindo a desenvolver resistências, nomeadamente à oxitetraciclina (Europa, 2011).

A legislação da União Europeia (Regulamento nº 37/2010) estabeleceu os LMRs para o amitraz, o cumafos e o ciamizol no mel, em valores de 200 µg/kg, 100 µg/kg e 1 mg/kg, respectivamente. Em relação à flumetrina e ao tau-fluvalinato os LMRs não estão estabelecidos para o mel. De acordo com a EMA não é necessário estabelecer o limite máximo de resíduos de fluvalinato em mel, uma vez que a concentração de resíduos em mel encontrados foram muito baixos, tendo em conta resultados experimentais enviados para a agência (< 10 µg/Kg). A toxicidade do fluvalinato após ingestão com óleo de milho é caracterizado pelas doses letais (DL₅₀) de 100 – 300 mg/kg de peso corporal para ratos e murganhos, contudo um tempo de exposição prolongado a este composto pode originar efeitos sub-letais (EMEA, 1995; Adamczyk *et al.*, 2010). Em relação à flumetrina a justificação para não estabelecimento do LMR deve-se ao facto de esta substância ser necessária em baixa quantidade para uso nas colmeias e de apresentar elevada solubilidade em água (EMEA, 1998).

1.11 - Monitorização de resíduos no mel

1.11.1 - Plano Nacional de Controlo de Resíduos

O controlo de resíduos de substâncias farmacologicamente activas, tanto para os produtos provenientes dos Estados Membros da União, como para os alimentos importados de países terceiros, inclusive o mel é obrigatório desde 1997, pelo estabelecido na Directiva 96/23/CE, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos, pela Decisão 97/747/CE, de 27 de Outubro de 1997, relativa ao nível e frequência de amostragens previstos pela Directiva 96/23/CE, e pela Decisão 98/179/CE da Comissão, de 23 de Fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos, transpostas para a legislação nacional, Decreto-lei nº 148/99, de 4 de Maio. Para além do cumprimento da legislação anterior, existe a obrigatoriedade de cumprir o estabelecido na Directiva 96/22/CE do Conselho, de 29 de Abril, relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de

substâncias beta-agonistas em produção animal, com as alterações que lhe foram introduzidas pela Directiva 2003/74/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 22 de Setembro, transposta para o Decreto-lei nº 185/05 de 4 de Novembro.

O Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, através da Direcção - Geral de Veterinária, pela Direcção de Serviços de Higiene Pública (DSHPV) é a entidade responsável pela concepção e coordenação da implementação dos sistemas de controlo, nomeadamente o Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR), que cumpre as exigências da legislação referida anteriormente, sendo obrigatório em todos os Estados-Membros da União Europeia.

No caso do mel as substâncias químicas a pesquisar são: subgrupo A6 – substâncias veterinárias não autorizadas (quadro 2, substâncias proibidas, do Regulamento nº 37/2010); subgrupo B 1 – substâncias antibacterianas, incluindo sulfamidas e quinolonas; subgrupo B2c – carbamatos e piretróides; subgrupo B3a – compostos organoclorados incluindo os PCB; subgrupo B3b – compostos organofosforados; subgrupo B3c – elementos químicos (metais pesados) (PNCR, 2009).

A nível nacional a colheita de amostras de mel é da responsabilidade do Ministério da Economia da Inovação e do Desenvolvimento (MEID), através da Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE). Para além das amostras recolhidas nas explorações são colhidas amostras oficiais nos postos de inspecção fronteiriços (PIF).

As análises são realizadas no Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV), a partir de amostragens aleatórias (a nível da exploração) em função da produção anual, a dimensão das amostras é estabelecida em função das necessidades dos métodos analíticos. As amostras podem ser recolhidas em qualquer ponto da cadeia de produção, desde que seja possível realizar a rastreabilidade. Anualmente o número mínimo de amostras a recolher é de dez por cada 300 toneladas de produção anual para as primeiras 3000 toneladas, e por cada 300 toneladas adicionais mais uma amostra, e é obrigatório respeitar as seguintes repartições: subgrupos B1 e B2c, 50% do total das amostras; subgrupos B3a, B3b e B3c, 40% do total das amostras. Nas restantes amostras (10%), as pesquisas são decididas de acordo com a experiência do Estado-membro (Decisão de Comissão 97/747/CE de 27 de Outubro).

As amostras que apresentam resultados positivos para substâncias incluídas no grupo A (substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas), e substâncias do grupo B (medicamentos veterinários e contaminantes), em que as amostras dão resultados acima dos LMRs estipulados (resultados não conformes), implicam uma série de procedimentos, ficando a

exploração sob controlo oficial. Todos estes resultados dão origem a contra-ordenações e coimas. Os produtos ficam interditos para a comercialização até esclarecimento da situação (Decreto-lei nº 148/99).

Os resultados dos planos são comunicados anualmente pelas autoridades nacionais à Comissão Europeia e disponibilizados para o público em geral na página da Direcção Geral de Saúde da União Europeia (DGSANCO).

1.11.2 - Resultados de não conformidades entre 2006 – 2009 em Portugal e na União Europeia

Na Tabela 13 apresentam-se os resultados referentes às amostras colhidas e o número de amostras com resultados não conformes para o mel (desde de 2006 até 2009) registados no Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR).

Tabela 13: Número de amostras colhidas e de amostras com resultados não conformes para o mel, registados no PNCR, entre 2006 e 2009 (adaptado de: DGV, PNCR).

Anos	Produção Portugal (Toneladas)	Amostras colhidas total	Amostras colhidas por subgrupo						Amostras não conformes
			A6	B1	B2c	B3a	B3b	B3c	
2006	5978	62	11	22	5	10	6	8	0
2007	6907	54	6	7	18	5	3	15	0
2008	6654	164	10	37	33	21	21	42	1 (B1)
2009	6919	114	10	32	32	20	0	20	0

Legenda: A6 – substâncias veterinárias não autorizadas, B1 – substâncias antibacterianas, B2c – carbamatos e piretróides, B3a – compostos organoclorados incluindo os PCB, B3b – compostos organofosforados, subgrupo B3c – elementos químicos

Como se pode verificar pela tabela anterior, em Portugal desde 2006 não foram registados resultados não conformes em mel para o subgrupo A6, B2c, B3a, B3b e B3c. No entanto em 2008 os resultados indicaram 1 amostra não conforme para o grupo B1 (substância antibacteriana).

Nos Postos de Inspeção Fronteiriços (PIF) em 2008 foram colhidas 2 amostras de mel, as análises indicaram que uma das amostras continha substância proibida e a outra amostra continha substância antibacteriana (PNCR, 2008).

Na Tabela 14 são apresentados os resultados referentes ao número de amostras colhidas e número de amostras não conformes obtidos pela Comunidade Europeia, desde 2006 até 2009, podendo

verificar-se que a maioria das amostras com resultados não conformes está relacionada com a presença de substâncias bacterianas (B1).

Tabela 14: Número de amostras colhidas e de amostras com resultados não conformes obtidos pela Comunidade Europeia, desde 2006 até 2009.

Anos	Produção (EU 27)	Amostras colhidas total	Amostras alvo não - conformes					
			A6	B1	B2c	B3a	B3b	B3c
2006	179211	5891	2	28	2	0	0	5
2007	188945	5850	1	19	1	0	0	16
2008	158694	5345	0	28	1	2	1	4
2009	162213	4826	0	23	0	1	0	4
Total			3	98	4	3	1	29

Legenda: A6 – substâncias veterinárias não autorizadas, B1 – substâncias antibacterianas, B2c – carbamatos e piretróides, B3a – compostos organoclorados incluindo os PCB, B3b – compostos organofosforados, subgrupo B3c – elementos químicos

1.11.3 - Estudos de pesquisa de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel na União Europeia

Em 1996, em Espanha, foram recolhidas 221 amostras de mel para determinação de acaricidas (cumafos, fluvalinato e amitraz), das quais 32 (14,5%) das amostras analisadas apresentaram-se positivas para a presença de cumafos, em 39 (17,6%) das amostras foi detectado fluvalinato e em 19 (8,6%) amitraz, contudo as concentrações detectadas na maioria das amostras encontravam-se abaixo do LMR estabelecido (García, Fernández, Herrero & Melgar, 1996). Em 2003, os autores Sabatini, Carpana, Serra & Colombo, em Itália, analisaram 215 amostras de mel, em que foi detectado cumafos em 30 (14%) amostras, estando a concentração de algumas delas acima do LMR estabelecido. Na Áustria, realizou-se a pesquisa de flumetrina em 33 amostras e em nenhuma delas foi detectada a substância (Menkissoglu-Spiroudi, Tsigouri, Diamantidis & Thrasyvoulou, 2001).

Na Tabela 15 são apresentados alguns dos estudos realizados na União Europeia quanto à pesquisa de resíduos de acaricidas sintéticos no mel.

Tabela 15: Resíduos de acaricidas sintéticos em mel em diferentes países da União Europeia.

Acaricida	Número de amostras realizadas	Amostras positivas	Concentração detectada (µg/kg)	País	Autor/ano
Cumafos	215	30	10 - 1000	Itália	Sabatini, 2003
Cumafos	221	32	1-53	Espanha	García <i>et al.</i> , 1996
Fluvalinato	71	1	1000	Itália	Sabatini <i>et al.</i> , 2003
Fluvalinato	221	39	1-15	Espanha	García <i>et al.</i> , 1996
Amitraz	221	19	33- 1820	Espanha	García <i>et al.</i> , 1996
Flumetrina	33	0	-----	Austria	Menkissoglu-Spiroudi, <i>et al.</i> , 2001

Na Bélgica, em 2000-2001, foram analisadas 72 amostras de mel, obtidas no mercado para determinação de resíduos de sulfamidas e tetraciclina, tendo sido detectadas sulfamidas em 3 (4,2%) amostras, tetraciclina em 2 (2,8%) amostras. Neste período foram também analisadas 248 amostras para determinação de estreptomicina, sendo 4 (1,6%) delas positivas para este antibiótico. Nestas amostras não foram detectados resíduos de cloranfenicol, nem de β-lactâmicos. Neste mesmo estudo, foram também analisadas amostras de mel importadas, sendo que em 108 amostras foi detectada estreptomicina em 51 (47,2%), em 98 amostras 31 (31,6%) deram positivas a sulfamidas, e 29 (29,6%) positivas a tetraciclina (Reybroeck, 2003). No ano de 2002, foram recolhidas 91 amostras no mercado Belga e 3 (3,3%) apresentaram resultado positivo para resíduos de sulfamidas. Nesse mesmo ano, na Polónia foram analisadas 20 amostras, das quais, 10 (50%) apresentaram resultado positivo para sulfamidas (Posyniak, Zmudzki, Niedzieska, Sniegocki & Grezebalska, 2003).

Ainda na Bélgica, em 2003, foram recolhidas 203 amostras de mel e em 12 (5,9%) foram detectados resíduos de sulfamidas (Reybroeck, Daeseire, Ooghe & Jacobs, 2004). Também na Itália Sabatini *et al.* (2003), detectaram resíduos de tetraciclina em 8 amostras de mel, num total de 112 amostras analisadas para determinação de resíduos de antibióticos. Em 2005, na Croácia, realizaram-se análises para 20 amostras, das quais 7 (35%) apresentaram-se positivas para resíduos de sulfamidas (Krivohlavek *et al.*, 2005). No nosso país, em 2008, realizaram-se 397 amostras, nas quais foram identificadas 53 amostras positivas para a presença de resíduos de sulfamidas em mel (Correia, 2008).

Em Portugal e Espanha, no período de 2001 a 2003, foi realizado um estudo para determinação de tetraciclina em mel (oxitetraciclina e tetraciclina), em que das 57 amostras analisadas (29 amostras do mercado nacional, 26 da comunidade espanhola e 2 com indicação de mel importado adquiridas no mercado português), não foram encontrados resíduos daquelas moléculas (Pena,

Pelantova, Lino, Silveira & Solich, 2005). Em 2006, na Grécia, Saridaki-Papakonstadinou, Andredakis, Burriel & Tsachev, detectaram que 29 % (73 em 251) das amostras continham resíduos de tetraciclinas. Em 2009, em Espanha, Vidal *et al.* detectaram em 16 amostras, 3 (1,8%) amostras positivas para a presença de antibióticos. Já na Turquia, Gunes *et al.* (2009) realizaram análises a 50 amostras para pesquisa de oxitetraciclina e sulfamidas e não detectaram resíduos destas substâncias nas amostras.

Na Tabela 16 são apresentados de forma resumida os resultados destes estudos.

Tabela 16: Resíduos de antibióticos identificados no mel em diferentes países da União Europeia.

Antibiótico	Número de amostras realizadas	Amostras positivas	Concentração (µg/Kg)	País	Autor/ano
Sulfamidas	20	10	1,0-5,6	Polónia	Posyniak <i>et al.</i> , 2003
Sulfamidas	72	3	nr	Bélgica	Reybroek, 2003
Sulfamidas	91	3	nr	Bélgica	Reybroek <i>et al.</i> , 2004
Sulfamidas	203	12	nr	Bélgica	Reybroek <i>et al.</i> , 2004
Sulfamidas	20	7	25-92	Croácia	Krivohlavek, 2005
Sulfamidas	397	53	1,3 - 73	Portugal	Correia, 2008
Tetraciclinas	72	2	nr	Bélgica	Reybroek, 2003
Tetraciclinas	112	8	100-1000	Itália	Sabatini <i>et al.</i> , 2003
Tetraciclinas	57	0	nr	Portugal e Espanha	Pena <i>et al.</i> , 2005
Tetraciclinas	251	73	13- 393	Grécia	Saridaki-Papakonstadinou, <i>et al.</i> , 2006
Multiresíduo	16	3	nr	Espanha	Vidal, <i>et al.</i> , 2009
Oxitetraciclina e sulfamidas	50	0	nr	Turquia	Gunes, <i>et al.</i> , 2009

Abreviaturas: nr - não referido

1.12 - Sistema de Alerta Rápido para os géneros alimentícios e alimentos para animais da União Europeia - Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)

O Regulamento (CE) n° 178/2002 de 28 de Janeiro⁵, estabelece um sistema de alerta rápido em rede para a notificação de riscos directos ou indirectos para a saúde humana, ligados a géneros alimentícios ou a alimentos para animais. Este sistema de alerta permite uma troca rápida e eficaz de informações entre os Estados - Membros e a Comissão Europeia sempre que se detectam riscos para a saúde humana na cadeia alimentar humana ou animal. Os membros do RASFF (Estados- Membros, Noruega, Liechtenstein e Islândia, Comissão Europeia, Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar⁶) dispõem de um serviço permanente para assegurar que as notificações urgentes são enviadas, recebidas e lhes é dada resposta no mais breve prazo, antes de causarem danos aos consumidores.

Em Portugal o contacto é o MADRP, através da Direcção - Geral de Veterinária, no que diz respeito a produtos a serem comercializados em Portugal. A DGV notifica a ASAE, e esta procede à elaboração de Ordens de Operações, com vista à retirada dos mesmos do circuito comercial.

No RASFF são produzidos e utilizados diferentes tipos de mensagens, notificações de alerta, notificações de informação, notificações notícia e rejeições nos postos fronteiriços.

As notificações de alerta são enviadas sempre que o género alimentício ou o alimento para animais que apresenta um risco grave já se encontra no mercado, sendo necessário adoptar medidas urgentes.

As notificações de informação são enviadas sempre que se identifica um risco, mas não é necessária uma acção imediata por parte de outros Estados-Membros. As notificações de notícia - “news”- são qualquer tipo de informação para a segurança alimentar que foi comunicada como alerta ou informação, considerada interessante para o controlo comunitário e divulgada como notícia. O último tipo de notificação diz respeito as notificações sobre produtos cuja entrada na Comunidade foi rejeitada, sendo-lhes dado outro destino ou destruídos (RASFF, 2009). Anualmente é elaborado um relatório onde são apresentados os resultados em relação à natureza,

⁵ Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios.

⁶ *European Food Safety Authority (EFSA)*, criada pelo Regulamento (CE) n° 178/2002, para reforçar o sistema de apoio científico e técnico envolvido na protecção da saúde do consumidor, no que diz respeito à segurança alimentar.

tipo e origem das notificações. Desde do ano de 2005 até ao ano de 2010 foram realizadas 745 notificações (informações/alertas) relacionadas com a presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos alimentares (Tabela 17). Os crustáceos, o mel/geleia real e o peixe são os produtos alimentares com maior número de notificações, 46 %, 23% e 16% respectivamente no período de 2005 a 2009 (Figura 6). Em relação ao ano de 2010 não é referido no relatório o número de notificações para cada alimento e por categoria de produto alimentar.

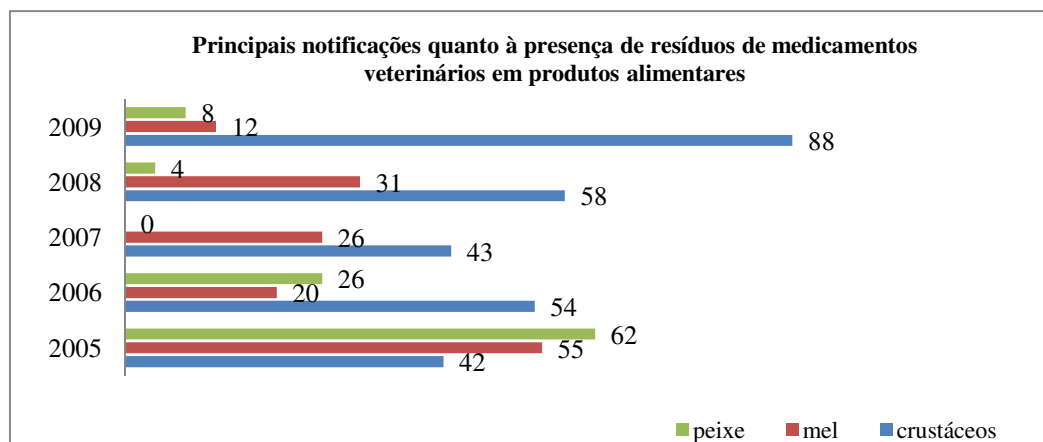
As notificações relacionadas com o mel, são na sua maioria devidas à presença de resíduos de medicamentos veterinários, principalmente cloranfenicol, tetraciclinas e sulfamidas (RASFF).

Tabela 17: Número de notificações referentes quanto ao mel/geleia real e à presença de resíduos de medicamentos veterinários, desde de 2005 a 2010 (Fonte: RASFF).

Ano	Notificações de resíduos de medicamentos veterinários em produtos alimentares (n)	Notificações em mel/geleia real (n)	Notificações de resíduos de medicamentos veterinários em mel /geleia real (n)	Notificações de resíduos de medicamentos veterinários em mel/geleia real (%)
2005	167	115	55	47,83
2006	116	84	20	23,80
2007	109	115	26	22,60
2008	105	42	31	73,80
2009	122	14	12	85,71
2010	126	17	nr	-----
Total	745	387	144	37,20

Abreviaturas: n – número de notificações; nr- não referido

Figura 6: Principais notificações referentes à presença de resíduos de medicamentos veterinários em produtos alimentares, de 2005 a 2009 (Fonte: RASFF).



1.13 - Métodos analíticos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em mel

Para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos têm sido desenvolvidos várias metodologias analíticas. Estas podem ser separadas em métodos de rastreio e em métodos de quantificação e/ou confirmação. O desenvolvimento destas implica várias etapas fundamentais para obtenção de resultados fiáveis, tal como a recolha de amostra, a preparação da amostra analítica, rastreio, quantificação e/ou confirmação.

De seguida é apresentado a importância de cada etapa na determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas presentes em medicamentos veterinários no mel e algumas limitações.

1.13.1 – Amostragem analítica

É o conjunto de operações com as quais se obtém, do material em estudo, uma porção desse material com tamanho adequado para realizar a análise no laboratório e que represente todo o conjunto da amostra. É uma operação fundamental no método analítico, uma vez que os resultados da análise apenas terão significado quando a porção do material adquirido para análise for representativa do sistema. Quando a amostra é homogénea, como por exemplo o mel, o processo de amostragem é simples, uma vez que qualquer fracção reflecte a composição média do conjunto.

1.13.2 - Preparação da Amostra Analítica – Técnicas de Extração, Purificação e Concentração

As etapas mais importantes e complicadas de um método para análise de resíduos de medicamentos veterinários em mel, são a extração da substância de interesse e a limpeza (*clean-up*) da amostra. A dificuldade aumenta quando o método tem como objectivo a extração simultânea de diversos compostos de interesse, que normalmente apresentam propriedades físico-químicas diferentes, mesmo pertencendo à mesma classe química (Peres, Airoidi & Reyes, 2007; Vidal *et al.*, 2009). Durante as últimas décadas, diferentes metodologias foram propostas com o intuito de diminuir a manipulação da amostra, de reduzir o contacto com substâncias prejudiciais à saúde, de aumentar significativamente o número de análises de amostras num determinado período de tempo.

A extracção tem em conta a transferência de um composto de uma fase para outra considerando a miscibilidade e o facto de os compostos apresentarem maior afinidade para determinados solventes. Um ponto de extrema importância é a escolha do solvente utilizado que deverá ser o mais apropriado possível, de forma a poder obter-se uma eficiência máxima de extracção e uma mínima co-extracção de compostos causadores de interferências.

A extracção de compostos orgânicos de produtos alimentares é usualmente realizada por vários procedimentos: extracção por solventes (extracção líquido-líquido); extracção em fase sólida (EFS); dispersão da matriz em fase sólida; micro-extracção em fase sólida; extracção em fluido super crítico. Os procedimentos para eliminar as substâncias interferentes são vários: separação líquido-líquido, cromatografia e inclusive a própria extracção em fase sólida (Atienza, Jiménez, Bernal & Martín, 1993; Martel & Zeggane, 2002; Rial- Otero, Gaspar, Moura & Capelo, 2007; Amolin, Hasan & Hejazy, 2009).

A extracção por fase sólida é uma das técnicas de extracção mais utilizadas para pesquisa de resíduos de medicamentos veterinários em amostras de produtos alimentares, inclusive o mel, dado que este método apresenta diversas vantagens em relação ao método clássico (extracção líquido-líquido), tais como, maior eficiência, redução do tempo de análise, evita emulsões, de fácil manuseamento, diminuição do consumo de solventes, é reproduzível e apresenta elevadas recuperações. É usada para preparação de amostras para cromatografia (Gasosa, Líquida e Camada Fina), espectrofotometria (UV, IV) e imuno-ensaios (Garcia *et al.*, 1996; Jansson, 2000; Korta, Bakkali, Berrueta, Gallo, Vicente, Kilchenmann & Bogdanov, 2001; Tsigouri, Menkissoglu – Spiround & Thrasyvoulou, 2001; Kamel & Al-Ghamdi, 2006; Picó, Fernández, Ruiz & Font, 2007; Rial-Otero *et al.*, 2007).

1.13.3 - Métodos de rastreio para substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares

Os métodos de rastreio são muito utilizados como primeira etapa na determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas e como alternativa para baixar custos e facilitar as análises. Contudo estes métodos devem ter a capacidade de detectar o analito ou a classe no nível de interesse.

Os requerimentos mínimos exigidos para uma metodologia de rastreio são a sensibilidade (sem perda de resultados positivos), a especificidade (número mínimo de falsos positivos), a

repetibilidade, a simplicidade de execução e a elevada quantidade de amostras que se podem manipular num dia (Tolrá & Reig, 2006).

Existem disponíveis diferentes metodologias para rastreio de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, tais como métodos microbiológicos, colorimétricos, ensaios imunoenzimáticos, ensaios com receptores imunodiorradioactivos (CHARM II) e cromatografia de camada fina. Contudo os métodos microbiológicos e colorimétricos apresentam algumas desvantagens, tais como a não identificação da substância, as interferências que podem conduzir a resultados “falsos positivos”, e ainda, o efeito de matriz (Posyniak *et al.*, 2002; Bonvehí & Gutiérrez, 2008).

1.13.3.1 -Teste Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

O teste de ELISA é um método de detecção imunológico para determinação quantitativa de antibióticos, através de anticorpos específicos. A base deste método é a interacção entre antigénios e anticorpos específicos, produzidos num organismo animal, geralmente o coelho, pelos linfócitos B. Devido à possibilidade de ocorrência de reacções cruzadas entre antibióticos da mesma classe, este método é usado apenas como determinação semi-quantitativa (Bogdanov, 2003; Munstedt, Rademacher, Petz, 2005).

1.13.3.2 - Teste Charm II

O teste Charm II é um método utilizado no rastreio de antibióticos em diferentes matrizes alimentares, tendo sido adaptado para o mel. Este método baseia-se na ligação específica de antibióticos a receptores. A detecção é determinada pela medição da radioactividade de ^3H ou ^{14}C . Este teste pode detectar a classe inteira dos antibióticos, permitindo detectar no mel os seguintes grupos de antibióticos: sulfamidas, tetraciclínas, macrólidos, anfenicóis e estreptomicina (aminoglicosídeos). O resultado indica apenas a ausência ou presença do grupo de antibióticos nas amostras. O teste Charm II exclui as amostras negativas, já amostras positivas devem ser confirmadas por outras metodologias analíticas, tais como a cromatografia líquida. Dependente do grupo a analisar o resultado é ou não fiável (por exemplo estreptomicina e sulfamidas). O ácido *p*-aminobenzóico (constituente natural do mel) pode influenciar o teste das sulfamidas e dar resultados “falsos positivos” (Bogdanov, 2003; Munstedt *et al.*, 2005).

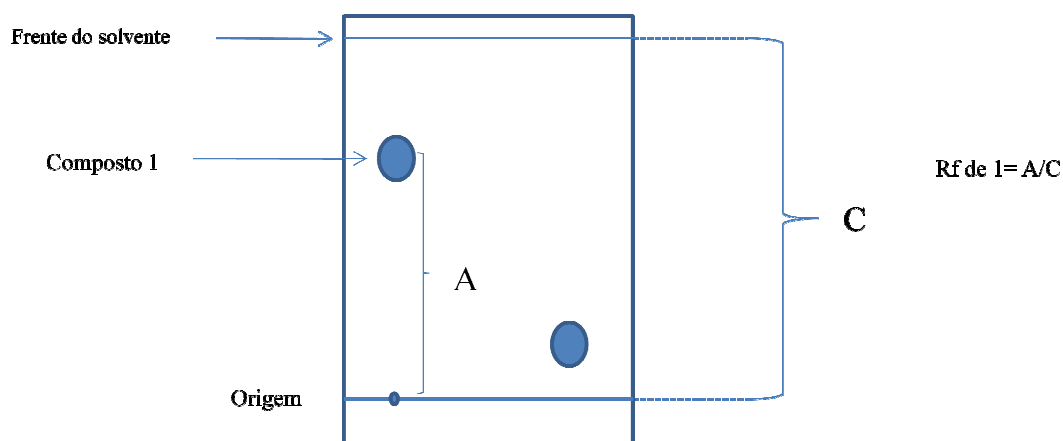
1.13.3.3 - Cromatografia de Camada Fina vs Cromatografia de Camada Fina de Alta Resolução

A cromatografia de camada fina é uma técnica de detecção, identificação e semi-quantitativa. As vantagens desta metodologia são a simplicidade, a flexibilidade, e o custo mínimo de material, apresentando-se, portanto, adequado à execução de determinações em série num espaço de tempo curto (Rezic, Horvat, Babic & Kastelan-Macan, 2005; Sherma, 2009).

Trata-se de um processo de separação no qual, a fase estacionária é constituída por material apropriado, disperso numa camada fina uniforme, fixa num suporte de vidro, de metal ou de plástico. A fase móvel é um líquido de baixa viscosidade, que elui através da fase estacionária, por capilaridade, uma vez que esta técnica se baseia nas propriedades polares dos diferentes compostos e das suas diferentes afinidades (eluentes vs constituintes da amostra), e portanto das suas características migratórias através da placa.

Os extractos das amostras são dispostos numa das extremidades da placa de cromatografia e esta é colocada numa tina cromatográfica, onde se encontra o eluente. O eluente utilizado é escolhido dependendo do composto em análise, principalmente da sua polaridade. Normalmente, em vez de um único eluente, utiliza-se um conjunto de eluentes de forma a garantir a total separação dos compostos da mistura. Após a eluição, a placa de cromatografia é visualizada numa câmara de luz UV/Vísivel (254-366 nm) onde a maior parte dos compostos são visualizados. Não se tratando de um método selectivo, só será possível diferenciar os compostos pretendidos dos outros compostos separados, por comparação com padrões, sendo o factor de retenção (R_f) uma das principais características de comparação. Este factor é definido como sendo a razão entre a distância percorrida por um dado composto e a distância percorrida pelo solvente. Em condições experimentais estabelecidas, o R_f é uma constante física própria de cada substância e seu valor varia de 0 a 1 (Figura 7).

Figura 7: Representação de cromatograma obtido por Cromatografia de Camada Fina e determinação do factor de retenção.



Um método complementar e específico de detecção é o método de revelação que tem por base a aspersão da placa de cromatografia com reagentes de revelação próprios para cada composto, verificando-se o aparecimento de uma coloração característica (compostos cromóforos), sendo a cor dependente dos grupos funcionais. O sucesso da cromatografia de camada fina depende na maioria das vezes do método ou métodos de detecção, visualização da placa sob luz UV/Vis (254/366 nm) e posteriormente a confirmação da presença do composto recorrendo aos reagentes de revelação específicos para as moléculas em estudo.

A cromatografia de camada fina de alta resolução, também conhecida por cromatografia planar, baseia-se nos mesmos princípios da técnica de cromatografia de camada fina, encontrando-se a grande diferença no facto da câmara de eluição ser horizontal em vez de vertical (Figura 8).

Figura 8: Tina de Cromatografia convencional (a) e Equipamento de cromatografia de camada fina de alta resolução (b) (Fonte: Autor).



Na câmara de eluição horizontal as placas utilizadas permitem que o desenvolvimento da cromatografia ocorra em ambos os lados, em direcção ao meio, o que possibilita a utilização de 36 a 72 amostras. Para além da possibilidade de analisar um maior número de amostras, por se poderem colocar amostras nas duas extremidades opostas da placa, havendo a eluição até ao centro desta, esta cromatografia também tem como vantagens uma maior rapidez, uma melhor resolução e uma melhor sensibilidade dos resultados.

Estas metodologias (juntamente com a cromatografia líquida e cromatografia gasosa) pertencem aos métodos de micro-análise, que desempenham um papel importante na investigação e em análises de rotina. Em muitos casos oferecem uma solução adequada e podem ser usadas como técnicas de confirmação ou alternativas (CAMAG, 2011).

1.13.4 - Determinação substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares

A determinação de compostos orgânicos é efectuada actualmente com recurso a técnicas cromatográficas (CG, CLAR) associadas a sistemas de detecção selectivos ou a espectrómetros de massa. A cromatografia é principalmente um processo de separação por migração diferencial entre 2 fases, a fase móvel e a fase estacionária, sendo estabelecidas interações entre os solutos e a fase estacionária, consoante o tipo de cromatografia.

Uma análise cromatográfica pressupõe que a concentração de um analito corresponda à composição real da matriz. O sistema de injeção pode actuar com efeitos discriminatórios que se manifestam pela introdução não quantitativa de certos componentes de uma mistura na coluna. Assim, o sistema de introdução de amostra deve obedecer aos seguintes critérios: não introduzir efeitos discriminantes dos componentes da amostra; não introduzir degradação térmica; ser quimicamente inerte; não ter efeitos adsortivos; ser independente do tamanho da amostra; não ter influência sobre a eficiência da coluna; permitir recuperação quantitativa total independentemente da concentração de cada um dos componentes; não ser influenciado por alterações dos parâmetros operacionais da coluna.

A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida são as técnicas indicadas para determinação e quantificação destes compostos utilizando-se para o efeito diferentes tipos de detectores, como captura electrónica (DCE); azoto-fósforo (DAF); ionização de chama (DIC), espectrometria de massa (EM), ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência (Atienza *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2001; Korta *et al.*, 2001; Martel & Zeggane, 2002; Kamel & Al- Ghamdi, 2006; Martel *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2007; Rial-Otero *et al.*, 2007; Ryoo *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

1.13.4.1 - Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa, tal como as outras técnicas cromatográficas, é usada para separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nesta técnica o eluente é um gás (N₂, H₂, He, Ar), inerte relativamente à amostra e à fase estacionária. O gás, denominado gás de arraste, atravessa a coluna, que contém a fase estacionária sob pressão, arrastando a amostra em estudo.

A cromatografia gasosa apresenta vantagens como a elevada eficiência, a selectividade, a rapidez e simplicidade, a fácil quantificação, a necessidade de amostra reduzida, a facilidade de automatização, ser uma técnica não destrutiva e permitir acoplamento com outras técnicas analíticas. Contudo esta técnica também apresenta algumas limitações, uma vez que as amostras têm que ser voláteis, ou seja, o seu ponto de ebulição tem de ser menor do que a temperatura de operação e têm de ser termicamente inertes.

1.13.4.2 - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAR) é usada para análise de compostos não voláteis. A cromatografia líquida de alta eficiência utiliza uma fase móvel líquida para separar os

compostos de uma mistura. A mistura é dissolvida num solvente e de seguida é forçada a eluir, sob pressão, através de uma coluna cromatográfica, onde será separada nos seus componentes.

A interacção do soluto com as fases móvel e estacionária pode ser manipulada pela escolha de diferentes eluentes e fases estacionárias. Assim, esta metodologia adquire um elevado grau de versatilidade, bem como a capacidade de separar facilmente uma larga variedade de compostos químicos.

1.13.5 - Confirmação de substâncias farmacologicamente activas em produtos alimentares

Existem diversos métodos de confirmação adequados para determinação de resíduos de medicamentos veterinários. Estas técnicas são a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa. Esta metodologia tem vindo a conquistar um papel importante na análise alimentar. Este facto deve-se à capacidade de detectar e identificar compostos químicos, aliada a uma elevada sensibilidade, rapidez de análise e capacidade de estudo de amostras complexas.

Na espectrometria de massa (EM) os compostos submetidos a uma baixa pressão são excitados pelo fornecimento de energia, quebrando-se ligações e gerando-se fragmentos iónicos que são separados de acordo com a relação massa/carga (m/z). A análise dos espectros de EM permite obter informação sobre a massa molecular dos compostos em estudo, e a análise da sua fragmentação em espectros de EM/EM fornece informação detalhada sobre a estrutura e composição química dos compostos, contudo, depende de instrumentos mais sofisticados e caros. De acordo com a bibliografia consultada, o uso da Cromatografia Gasosa e/ou Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrómetro de Massa e a Cromatografia Líquida são os métodos de eleição para determinação de resíduos de medicamentos veterinários (acaricidas e antibióticos) (Atienza *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1996; Albero *et al.*, 2001; Korta *et al.*, 2001; Martel & Zeggane 2002; Kamel *et al.*, 2006; Martel *et al.*, 2007; Peres *et al.*, 2007; Rial-Otero *et al.*, 2007; Ryoo *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

Na Tabela 18 são indicados os diferentes métodos cromatográficos para determinação de resíduos de acaricidas em mel, descritos na literatura consultada.

Tabela 18: Metodologias analíticas para pesquisa de acaricidas em mel (adaptado de Rial- Otero *et al.*, 2007).

Extracção	Técnica/Detector	Composto	Autor/ano
EFS	CLAR-UV	Fluvalinato	Atienza <i>et al.</i> , 1993
ELL/ EFS - Florisil	CG-DAF	Cumafos, amitraz, fluvalinato	Garcia <i>et al.</i> , 1996
EFS	CG-DIC	Cumafos, Amitraz, bromopropilato, Fluvalinato	Fernandez <i>et al.</i> , 1997
EFS – Oasis HLB	CG-DCE, CG-DAF	Multiresíduo	Jansson, 2000
EFS- C8	CG -DEC	Tau- fluvalinato	Tsigouri <i>et al.</i> , 2001
EFS- C18	CG -EM	Bromopropilato, cimiazole, clordimeforme, clorofenvifos, 4,4'- dibromobenzophenona	Korta <i>et al.</i> , 2001
ELL	CLAR- UV	Cumafos, Bromopropilato, Amitraz, Fluvalinato, Timol, Rotenona	Martel & Zeggane, 2002
ELL	CLAR-UV	Amitraz, Cumafos, Fluvalinato	Martel <i>et al.</i> , 2007
ELL	CLAR-UV	Amitraz, Bromopropilato, cumafos, cimiazole, 2,4-Dimetilanilina	Ryoo, 2008
ELL EFS-Florisil	CG-EM	Amitraz, bromopropilato, cumafos, tetradifon	Hong, 2009

Legenda: ELL – Extracção líquido – líquido; EFS – Extracção em fase sólida; CLAR – Cromatografia Líquida de Alta Resolução; CG – Cromatografia Gasosa; Detector DAF- Detector Azoto-fósforo; DIC – Detector de ionização de chama; DEC – Detector de captura electrónica; EM – Espectrometria de massa; UV- Ultravioleta

Na Tabela 19 são apresentados de forma resumida alguns métodos analíticos utilizados por vários autores para determinação de antibióticos em produtos alimentares, tais como mel, leite, carne, ovos. Entre as metodologias analíticas destaca-se cromatografia líquida, a cromatografia de camada fina, o teste CHARM II (Martel & Zeggane, 2003; Pang, Cao, Zhang, Jia, 2003; Posyniak *et al.*, 2003; Maudens *et al.*, 2004; Krivolavek *et al.*, 2005; Pena *et al.*, 2005; Rodrigues, São Braz, Abreu, Correia, Silva, 2006; Saridaki-Papakonstadinou *et al.*, 2006; Tajick & Shohreh, 2006; Correia, 2008; Lopez, Pettis, Smith, Chu, 2008; Jornet, González-Martínez, Puchades, Maquiera, 2010).

Tabela 19: Metodologias Analíticas para pesquisa de Antibióticos em diferentes produtos alimentares.

Produto alimentar	Extracção	Técnica	Composto	Autor/ano
Mel	ELL	CLAR	Sulfatiazol	Martel & Zeggane, 2003
Mel	EFS	CLAR	Sulfamidas	Pang <i>et al.</i> , 2003
Mel	EFS	CLAR	Sulfamidas	Posyniak <i>et al.</i> , 2003
Mel	-----	CHARM II/ CLAR	Estreptomicina Tetraciclinas Sulfamidas β -Lactâmicos Cloranfenicol	Reybroeck, 2003
Mel	ELL/EFS	CLAR	Sulfamidas	Maudens <i>et al.</i> , 2004
Mel	EFS	CLAR-EM	Sulfamidas	Krivolavek <i>et al.</i> , 2005
Mel	EFS	CLAR	Tetraciclinas	Pena <i>et al.</i> , 2005
Leite	EFS	CCF	Multi-resíduo	Rodrigues <i>et al.</i> , 2006
Mel	EFS	CLAR	Tetraciclinas	Saridaki-Papakonstadinou <i>et al.</i> , 2006
Carne	ELL	CCF	Antibióticos	Tajick & Shohreh, 2006
Mel	EFS	CLAR	Sulfamidas	Correia, 2008
Mel	EFS	CL-EM/EM	Multi-resíduo	Lopez <i>et al.</i> , 2008
Ovos/ Carne	ELL	CCF	Sulfamidas	United States Department of Agriculture, 2009
Mel	EFS	CLUR	Multi-resíduo	Vidal <i>et al.</i> , 2009
Mel/ água	-----	ELISA	Sulfatiazol	Jornet <i>et al.</i> , 2010
Mel	EFS	CCF/CCFAR	Tetraciclinas	Applied Separations, 2010

Legenda: ELL- Extracção líquido-líquido; EFS- Extracção em fase sólida; CLAR – Cromatografia líquida de alta resolução; CCF- Cromatografia de camada fina; CL- Cromatografia líquida; CCFAR – Cromatografia de camada fina de alta resolução; CLUR – Cromatografia líquida de ultra resolução; EM- Espectrometria de massa; ELISA – Teste *Enzyme linked immunosorbent Assay*.

1.14 - Validação de Métodos Cromatográficos

Para determinações de substâncias orgânicas em produtos alimentares, os métodos cromatográficos são os eleitos, uma vez que permitem análises qualitativas e quantitativas. Para que os métodos garantam resultados fiáveis é necessário que cumpram vários requisitos estabelecidos por entidades reguladoras, e instituições de harmonização, como por exemplo *Food and Drug Administration* – FDA, *International Conference on Harmonisation* – ICH, *European Medicines Agency* - EMA, e *International Union of Pure and Applied Chemistry* - IUPAC, que disponibilizam guias para procedimentos de validação de métodos analíticos.

A validação de métodos é um passo muito importante que deve ser realizado antes do método analítico poder ser usado para as análises de rotina. Validar um método analítico consiste em demonstrar que ele é adequado para o fim a que se destina, isto é, um laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos implementados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de utilização e extensões ou modificações de métodos normalizados, para confirmar que os métodos são adequados à utilização a que se destinam (NP ISO/IEC 17025, 2000).

1.14.1 - Validação de Métodos de Rastreio

A validação de métodos de rastreio é baseada no limite de detecção, sensibilidade (sem perda de resultados positivos) e a especificidade (número mínimo de falsos positivos).

A sensibilidade é a probabilidade de um método originar um resultado positivo, sendo a amostra positiva. A especificidade é a probabilidade de um método originar um resultado negativo, sendo a amostra negativa. Estes parâmetros são determinados pelas equações 1 e 2, respectivamente.

$$S(\%) = \frac{a}{a + c} \times 100$$

Equação 1

$$E(\%) = \frac{d}{b + d} \times 100$$

Equação 2

Sendo: a - Verdadeiro positivo; b - Falso positivo; c - Falso negativo; d – Verdadeiro negativo

Para além dos parâmetros referidos deve ter-se em conta a determinação de “falsos positivos” e “falsos negativos”. Para tal determina-se o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN).

O valor preditivo positivo (VPP) consiste na proporção de resultados positivos reais entre todas as amostras com resultado positivo (Equação 3).

$$VPP(\%) = \frac{a}{a+b} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

O valor preditivo negativo (VPN) consiste na proporção de resultados negativos reais entre todas as amostras com resultado negativo (Equação 4).

$$VPN(\%) = \frac{d}{c+d} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

A existência de falsos positivos é aceitável, uma vez que estes resultados irão ser submetidos a confirmação, contudo o método deve reduzir ou evitar o número de falsos negativos, uma vez que estes não irão ser submetidos a confirmação.

A eficiência do método (EF) é dada pela proporção dos resultados que o método classifica correctamente (equação 5).

$$EF(\%) = \frac{a+d}{a+b+c+d} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Tabela 20: Determinação de avaliação da eficiência de um método.

Teste	Composto presente	Composto ausente	Total
Positivo	Verdadeiro positivo (a)	Falso positivo (b)	a + b
Negativo	Falso negativo (c)	Verdadeiro negativo (d)	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

De acordo com a Decisão de Comissão 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002, as técnicas analíticas utilizadas para efeitos de rastreio devem ter uma taxa de resultados conformes <5% (erro β) ao nível requerido. Em caso de suspeita de um resultado não conforme, este deve ser confirmado recorrendo a um método de confirmação.

Para além do referido na metodologia de cromatografia de camada fina os valores do factor de retenção (Rf) da substância a analisar devem corresponder aos valores de Rf dos padrões com um

limite de $\pm 5\%$; o aspecto visual da substância a analisar não deve ser diferente do aspecto visual da substância padrão; para manchas da mesma cor, a distância entre o centro da mancha, referente à substância a analisar, e o da mancha mais próxima deve ser, pelo menos, metade da soma dos diâmetros das manchas.

1.14.2 - Validação de métodos de confirmação (quantitativos)

Embora exista algum consenso, e mesmo regulamentação, quanto ao tipo de estudos a realizar no decorrer de uma validação, existe uma grande diversidade de opiniões quanto à forma de os abordar. Contudo o processo de validação de um método não pode ser separado do seu desenvolvimento, ou seja, as condições analíticas apenas serão aceitáveis ou não, quando o estudo de validação estiver terminado.

Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação de métodos cromatográficos quantitativos para estudos de resíduos em produtos alimentares são: selectividade, especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exactidão, robustez (esta só é usada quando se pretende publicar o Método em Norma) e estabilidade (EMA, 2011).

A selectividade e especificidade avaliam a capacidade de um método analítico medir a substância a analisar na presença de interferentes existentes na amostra. Os interferentes podem ser impurezas, metabolitos, produtos de degradação e isómeros (EMA, 2011).

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade de obter, num intervalo determinado, resultados directamente proporcionais à concentração. Os resultados são utilizados para calcular a recta de regressão que relaciona a concentração analítica com a resposta do método (EMA, 2011).

O limite de detecção (LD) corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar numa amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como valor exacto, sob as condições experimentais estabelecidas, ou seja, é a menor quantidade que pode ser diferenciada, de modo confiável do zero ou do ruído de fundo.

O limite de detecção pode ser expresso como (Equação 6) (EMA, 2011):

$$L.D. = \frac{[3.3 \times \sigma]}{S} \quad \text{Equação 6}$$

Legenda: σ = desvio padrão da regressão linear; S = declive da curva de calibração

O limite de quantificação (LQ) corresponde à mais pequena concentração a partir do qual é possível a quantificação do composto, com uma determinada exactidão e precisão. O limite de quantificação pode ser determinado de acordo com a equação 7 (EMA, 2011).

$$LQ. = \frac{[10 \times \sigma]}{S} \quad \text{Equação 7}$$

Legenda: σ = desvio padrão da regressão linear; S = declive da curva de calibração

A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas para uma mesma amostra, amostras semelhantes ou uma solução padrão, em condições definidas. A precisão é normalmente avaliada usando o valor do coeficiente de variação ou o valor do desvio padrão relativo (EMA, 2011).

$$CV (\%) = (S/\mu) * 100 \quad \text{Equação 8}$$

Legenda: s é o desvio padrão absoluto e μ é a média aritmética das medições.

A exactidão avalia a proximidade entre o resultado de um ensaio e o seu valor de referência aceite como verdadeiro. Geralmente expressa-se como percentagem de recuperação (Equação 9) (EMA, 2011).

$$R(\%) = \frac{C1 - C2}{C3} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Legenda: R = Recuperação obtida do composto em estudo, C1= Concentração determinada, C2= Concentração determinada na amostra não adicionada, C3= Concentração adicionada.

A robutez de um método analítico é a medida da capacidade do método em se manter inalterável no seu desempenho analítico face a pequenas variações nos seus parâmetros experimentais. As mudanças introduzidas nesta avaliação reflectem as alterações possíveis que podem acontecer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (EMA, 2011).

A avaliação da estabilidade dos compostos é realizada na matriz e nos padrões de calibração, uma vez que a degradação do composto ou dos constituintes da matriz, durante o armazenamento ou análise da amostra podem afectar a exactidão dos resultados. A estabilidade do composto deve ser determinada de modo a reproduzir as condições reais de armazenamento, manuseamento e análise (EMA, 2011).

Capítulo II – Desenvolvimento Experimental

2.1 - Objectivos do trabalho

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia, Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa, no período de Outubro de 2010 a Novembro de 2011 e pretendeu cumprir três objectivos. No primeiro, promoveu-se o desenvolvimento e a optimização de metodologias analíticas para detecção e identificação de acaricidas e antibióticos em amostras de mel de abelha (*Apis mellifera*). No segundo objectivo, pretendeu-se a determinação de acaricidas sintéticos e antibióticos em amostras comerciais de mel de néctar e por fim a avaliação de risco em termos de segurança alimentar.

2.2 - Desenho experimental

2.2.1 - Desenvolvimento laboratorial das metodologias de análise para rastreio dos resíduos de substâncias farmacologicamente activas em mel

2.2.1.A - Desenvolvimento e optimização da metodologia analítica para rastreio de acaricidas (cumafos, fluvalinato e flumetrina) em mel

A cromatografia de camada fina e a cromatografia gasosa foram as metodologias escolhidas e desenvolvidas neste estudo para detecção e identificação dos acaricidas cumafos, tau-fluvalinato e flumetrina em mel.

A.1 - Material e Métodos

A.1.1 - Reagentes

Metanol (Merck, 1,06009), Dicloreto de paládio (Applichem, A0862), Ácido sulfúrico (Panreac, 131058), Anisaldeído (Sigma-Aldrich, A-0519), Ácido acético glacial (Merck, 63), Ácido clorídrico (Sigma-Aldrich, 30721), Metassulfato de fenazina (PMS) (Applichem, A2212), Cloreto de 2 - (*p*-iodofenil) - 3 - (*p*-nitrofenil) - 5-feniltetrazólio (INT) (Applichem, A6248), Acetonitrilo (Pronolabo, 20060.320), *n*-hexano (Pronolabo, 24575.320), Acetona (Fisher Scientific, A/0600/17). Como padrões de acaricidas foram utilizados o Tau-fluvalinato (46294, Sigma-Aldrich), a Flumetrina (46417, Sigma-Aldrich) e o Cumafos (Fluka, 45403). A água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore®. Toda a

vidraria e materiais utilizados foram lavados com Extran neutro e enxaguados com água destilada.

A.1.2 - Equipamentos

Balança digital (Precisa 125 A, Max =100 g, 0.0001 mg), Evaporador rotativo (HEIDOLPH W 2000), Lâmpada de UV 254-366 nm (CAMAG UV- CABINET II), Estufa (MELAG), Placas de alumínio cobertas com sílica-gel G, 60 F₂₅₄ (Merck Darmstadt Germany, 1.05554), Tina de cromatografia, Cartuchos C18 sepPak de 200 mg (Waters Oasis, Milford, MA, USA). Cromatógrafo Gasoso Agilent, Technologies, 6890 N com software Agilent Chemstation (2001 – 2010) com coluna capilar: HP-35 35% fenil- metil- siloxano, 30 m, diâmetro interno de 320 µm e uma espessura de filme de 0,25 µm e com detector de captura electrónica.

A.1.3 - Procedimento Experimental

A.1.3.1 - Detecção/identificação de acaricidas por Cromatografia de Camada Fina

Foram preparadas soluções padrão de cada acaricida com uma concentração final de 1 mg/ml em metanol. A partir desta solução realizaram-se diluições seriadas, de forma a obter concentrações inferiores e por conseguinte limites de detecção menores.

As soluções padrão dos acaricidas (cumafos, flumetrina e tau-fluvalinato) foram aplicadas nas cromatofolhas com auxílio de capilar e de seguida foi realizada a eluição (n-hexano/acetona (80:20 v/v)) em tina vertical. Após a eluição das placas, estas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente foram as manchas obtidas visualizadas em câmara de visualização a 254 nm e 366 nm. De modo a confirmar a presença de cada acaricida, as placas foram pulverizadas com as seguintes soluções para visualização das manchas: a) Solução ácido sulfúrico - anisaldeído (reagente de p-anisaldeído); b) Solução de dicloreto de paládio 0,5% e HCl 1 M; C) Solução hidróxido de potássio 20% em metanol; Solução de cloreto de 2 - (p-iodofenil) - 3- (p-nitrofenil) - 5 -feniltetrazólio (INT) 0,4% e solução de metassulfato de fenazina (PMS) 0,1% (10:2 (v/v)). Após a pulverização as placas foram secas a 110°C, durante 1- 2 minutos.

Os resultados desta metodologia são dados pelo factor de retenção obtidos para cada padrão, através da razão entre a distância do ponto de aplicação ao meio da mancha e a distância percorrida pelo eluente, e ainda por visualização da cor após pulverização com os reagentes específicos.

A.1.3.2 - Amostras

Para realização do desenvolvimento da metodologia de rastreio de acaricidas em mel foram utilizadas amostras de mel biológico (“branco”), considerando que este é isento de resíduos de medicamentos veterinários e amostras de mel biológico fortificado com diferentes concentrações de cada acaricida.

A.1.3.3 - Preparação das amostras

A metodologia escolhida para extracção de acaricidas em amostras de mel foi a extracção em fase sólida.

As amostras de mel foram homogeneizadas, sob agitação, com metanol e água (70:30 v/v). Os cartuchos utilizados, C18 SepPak, foram condicionados com metanol, acetonitrilo e equilibrados com água. As amostras de mel foram eluídas, sob gravidade, com metanol e acetonitrilo. O extracto obtido foi evaporado até resíduo seco à temperatura ambiente. Após obtenção do resíduo seco, este foi dissolvido em 1 ml de metanol e analisado por cromatografia de camada fina.

A.1.3.4 - Avaliação da eficiência do método analítico para rastreio de acaricidas em amostras de mel

De modo a avaliar a eficiência do método de rastreio, foram fortificadas 10 amostras de mel com os acaricidas a pesquisar e utilizaram-se 10 brancos. Os parâmetros avaliados foram a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo.

A.1.3.5 - Detecção/identificação de acaricidas por Cromatografia Gasosa

Para determinação do perfil cromatográfico de cada um dos compostos foram injectados 2 µl de cada uma das soluções padrão dos acaricidas (1 mg/ml) e a amostra de mel considerada como branco.

As condições da análise cromatográfica utilizadas para as substâncias a pesquisar foram as seguintes: Injecção: split (15:1); Temperatura do injector: 150°C; Forno: 185°C (3 minuto) até 290°C a 12°C/min (5 minutos); Coluna capilar: HP-35 35% fenil- metil- siloxano, 30 m, diâmetro interno de 320 µm e uma espessura de filme de 0,25 µm; Detector de Captura electrónica (250°C); o gás de arraste utilizado foi o hidrogénio e o gás de limpeza o azoto. Tempo total da corrida 25,5 minutos.

A.1.4 - Análise Estatística

Nesta fase experimental foi realizada estatística descritiva, ou seja, calculou-se a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação do parâmetro factor de retenção para cada um dos acaricidas. Para tal utilizou-se o programa Microsoft Excel para Windows-versão 2010, Microsoft.

2.2.1.B - Desenvolvimento e optimização da metodologia analítica para rastreio de Tetraciclina e Sulfamidas em mel

A cromatografia de camada fina foi a metodologia escolhida para detecção de Sulfamidas (Sulfatiazol e Sulfametoxazole) e Tetraciclina (Tetraciclina e Oxitetraciclina) em amostras de mel. Como referido anteriormente, este método apresenta várias vantagens como metodologia de rastreio.

B.1 - Material e Métodos

B.1.1 - Reagentes

Metanol (Merck, 1,06009), Hidróxido de sódio (Merck, 5033), Anisaldeído (Sigma-Aldrich, A-0519), Ácido acético glacial (Merck, 63), (Panreac, 131058), Iodo (Merck, 4761), Etanol - 96% (Merck, 1,00983,2511), Acetonitrilo (Pronolabo, 20060.320), n-hexano (Pronolabo, 24575.320), Acetona (Fisher Scientific, A/0600/17), 1 – butanol (Merck, 1990), Clorofórmio (Carlo Erba, 43603), Acetato de etilo (Lab-Scan Analytical Sciences, A13A11), Amónia 25% (Merck, 5428), Ácido cítrico monohidratado (Merck, 244), Ácido etilenodiaminotetracético (Merck, 4761), Di-sódio hidrogéniofosfato (pronolabo, 28029.292), Fluorescamina (Sigma- Aldrich, F5928). Como padrões de sulfamidas foram utilizados o Sulfatiazol (Sigma- Aldrich, S9876), o Sulfametoxazole (Sigma- Aldrich, S-7507) e como padrões de tetraciclina a Tetraciclina (Sigma- Aldrich, T-3383) e a Oxitetraciclina (Applichem, A5257). A água desionizada foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore®. Toda a vidraria e materiais utilizados foram lavados com Extran neutro e enxaguados com água destilada.

B.1.2 - Equipamentos

Balança digital (Precisa 125 A, Max =100 g, 0.0001 mg), Evaporador rotativo (HEIDOLPH W 2000), Lâmpada de UV 254-366 nm (CAMAG UV- CABINET II), Estufa (MELAG), Placas de

alumínio cobertas com sílica-gel G, 60 F₂₅₄ (1.05554, Merck Darmstadt Germany), Tina de cromatografia, Cartuchos C18 sepPak de 200 mg (Waters Oasis, Milford, MA, USA).

B.1.3 - Procedimento experimental

B.1.3.1 - Detecção/identificação de Tetraciclinas e Sulfamidas por Cromatografia de Camada Fina

Foram preparadas soluções padrão de cada antibiótico com uma concentração final de 1 mg/ml em metanol. A partir desta solução realizaram-se diluições seriadas, de forma a obter concentrações inferiores e por conseguinte limites de detecção menores.

As soluções padrão dos antibióticos foram aplicados nas cromatofolhas com auxílio de capilar e de seguida foi realizada a eluição em tina vertical.

Foram testados vários sistemas de eluição para determinação do factor de retenção ideal para cada composto. Para detecção das tetraciclinas avaliaram-se os seguintes sistemas de eluição, n-butanol, ácido acético e água na proporção de 30:10:10, (v/v/v), respectivamente; n-butanol, etanol, clorofórmio, amónia a 25% (40:50:20:50, v/v), respectivamente e solução de ácido cítrico a 10%, n-hexano, etanol (80:10:10, v/v) respectivamente.

Para além dos sistemas de eluição referidos anteriormente foi avaliado também a solução de clorofórmio, metanol e 5% de EDTA na proporção de 65:20:5 (v/v/v), respectivamente, contudo as cromotofolhas foram previamente tratadas com solução de EDTA 0,27 M pH=9 e secas à temperatura ambiente durante 2 horas. Antes de proceder à eluição das tetraciclinas, as cromotofolhas foram activadas à temperatura de 110°C, durante 30 minutos.

Para detecção das Sulfamidas avaliaram-se os seguintes sistemas de eluição clorofórmio e metanol na proporção 80:20 (v/v), clorofórmio e metanol na proporção 90:10 (v/v) e acetato de etilo, metanol e amónia (25%) na proporção 30:15:1 (v/v).

Após a eluição das placas, estas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente as manchas obtidas visualizadas na câmara de visualização a 254 nm e 366 nm.

De modo a confirmar a presença de cada antibiótico, as placas foram pulverizadas com reagentes de visualização apropriados a cada substância.

Para confirmação da presença de tetraciclinas utilizou-se a solução de ácido sulfúrico - anisaldeído (reagente de *p* - anisaldeído) e solução de iodo a 1% em etanol e ácido sulfúrico a 16%. Após a pulverização das cromotofolhas com a solução *p*-anisaldeído, estas foram aquecidas em estufa à temperatura de 110°C, durante 2 – 5 minutos. Já as cromotofolhas pulverizadas com a

solução de iodo foram secas à temperatura ambiente. Para confirmação da presença de sulfamidas utilizaram-se os reagentes anteriores e também uma solução de fluorescamina.

Os resultados desta metodologia são dados pelos factores de retenção obtidos para cada padrão, através da razão entre a distância do ponto de aplicação ao meio da mancha e a distância percorrida pelo eluente, e ainda por visualização da cor após pulverização com os reagentes específicos.

B.1.3.2 - Amostras

Para realização do desenvolvimento da metodologia de rastreio de acaricidas em mel foram utilizadas amostras de mel biológico (“branco”), considerando que este é isento de resíduos de medicamentos veterinários e amostras de mel biológico fortificado com diferentes concentrações de cada antibiótico.

B.1.3.3 - Preparação das amostras

A metodologia escolhida para extracção de antibióticos em amostras de mel foi a extracção em fase sólida.

As amostras foram homogeneizadas com a solução NA_2EDTA 0,1 M -Tampão *Mcllvaine* pH 4. Os cartuchos utilizados, C18 SepPak, foram condicionados com metanol, acetonitrilo e solução de EDTA e equilibrados com água. As amostras de mel foram eluídas, sob gravidade, com metanol e acetonitrilo. O extracto obtido foi evaporado até resíduo seco à temperatura ambiente. Após obtenção do resíduo seco, este foi dissolvido em 1 ml de metanol e analisado por cromatografia de camada fina.

B.1.3.4 - Avaliação da eficiência do método analítico para rastreio de antibióticos em amostras de mel.

De modo a avaliar eficiência do método de rastreio de antibióticos, foram fortificadas 10 amostras de mel com os antibióticos a pesquisar e utilizaram-se 10 brancos. Os parâmetros avaliados foram a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo.

B.1.4 - Análise Estatística

Nesta fase experimental foi realizada estatística descritiva, ou seja, calculou-se a média aritmética, o desvio padrão e o coeficiente de variação do parâmetro Factor de Retenção para

cada um dos antibióticos. Para tal utilizou-se o programa Microsoft Excel para Windows-versão 2010, Microsoft.

2.2.2 – Determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional

2.2.2.1 – Amostras

De acordo com a Decisão de Comissão 97/747/CE de 27 de Outubro e para o Plano Nacional de Controlo de Resíduos, o número mínimo de amostras estimadas, face à produção de mel no ano de 2009 (aproximadamente 7000 t), seria de 115. No entanto neste estudo foram obtidas 42 amostras do mercado nacional e directamente do produtor, das diferentes regiões de Portugal, durante o período de Outubro de 2010 a Junho de 2011 (Tabela 21).

Tabela 21: Amostras recolhidas pelas diferentes regiões de Portugal.

Região Portugal	Número de amostras (n)
Norte	5
Centro	12
Lisboa e Vale do Tejo	11
Alentejo	6
Algarve	5
Região Autónoma dos Açores	3

As amostras foram recolhidas de forma aleatória no que diz respeito, quer ao estabelecimento de venda, quer ao lote de fabrico, quer ao produtor. E de modo a que fosse possível relaciona-las com a origem de produção.

A dimensão de cada amostra analítica foi de 10 g, de acordo com a necessidade das metodologias analíticas. As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e protegidas da luz.

2.2.2.2 - Determinação de acaricidas e antibióticos em amostras de mel

2.2.2.2.1 – Procedimento Experimental

A extracção dos acaricidas e dos antibióticos das amostras de mel recolhidas a nível nacional foi realizada de acordo com o descrito anteriormente nos pontos A.1.3.3 e B.1.3.3, respectivamente.

Para detecção e identificação dos acaricidas foi utilizada a cromatografia de camada fina de acordo com o descrito no ponto A.1.3.1 e cromatografia gasosa de acordo com o ponto A.1.3.5.

Para detecção da presença de tetraciclina e sulfamidas nas amostras de mel utilizou-se o procedimento descrito no ponto B.1.3.1, contudo para confirmação da presença de tetraciclina foi apenas utilizada, a solução de *p*-anisaldeído. Para confirmação da presença de sulfamidas utilizou-se somente a solução de fluorescamina.

Capítulo III - Resultados e Discussão

3.1 - Detecção/identificação de Acaricidas sintéticos por Cromatografia de Camada Fina

Como referido a técnica utilizada para a detecção dos acaricidas nas amostras de mel foi a cromatografia de camada fina.

O eluente seleccionado para separação dos acaricidas em estudo foi a solução n-hexano/acetona na proporção de 80:20 (v/v), a qual se havia revelado eficaz na separação destas moléculas.

A visualização foi feita a 254 e 366 nm e revelação com reagentes de visualização.

Na Tabela 22 são apresentados os valores obtidos para o factor de retenção de cada molécula.

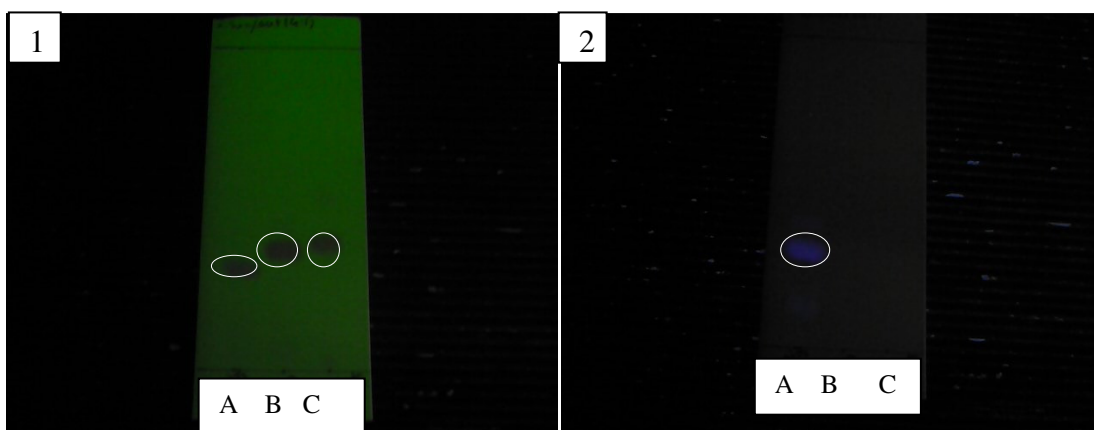
Tabela 22: Estatística descritiva dos valores de Rf (média, desvio padrão e coeficiente de variação) para cada acaricida sintético estudado ($n=9$).

Acaricida sintético	Sistema de Eluição	Média	DP	CV (%)
Flumetrina	A	0,28	0,002	0,54
Tau-fluvalinato	A	0,35	0,013	3,80
Cumafos	A	0,30	0,014	4,55

Legenda: A: n-hexano/acetona (80:20, (v/v))

Após a eluição, as placas, foram visualizadas na câmara de UV/Vis (254 nm – 366 nm), tendo-se verificado que apenas o Cumafos era visível a 366 nm (Figura 9).

Figura 9: Visualização a 254/366 nm das manchas correspondentes para os acaricidas estudados.

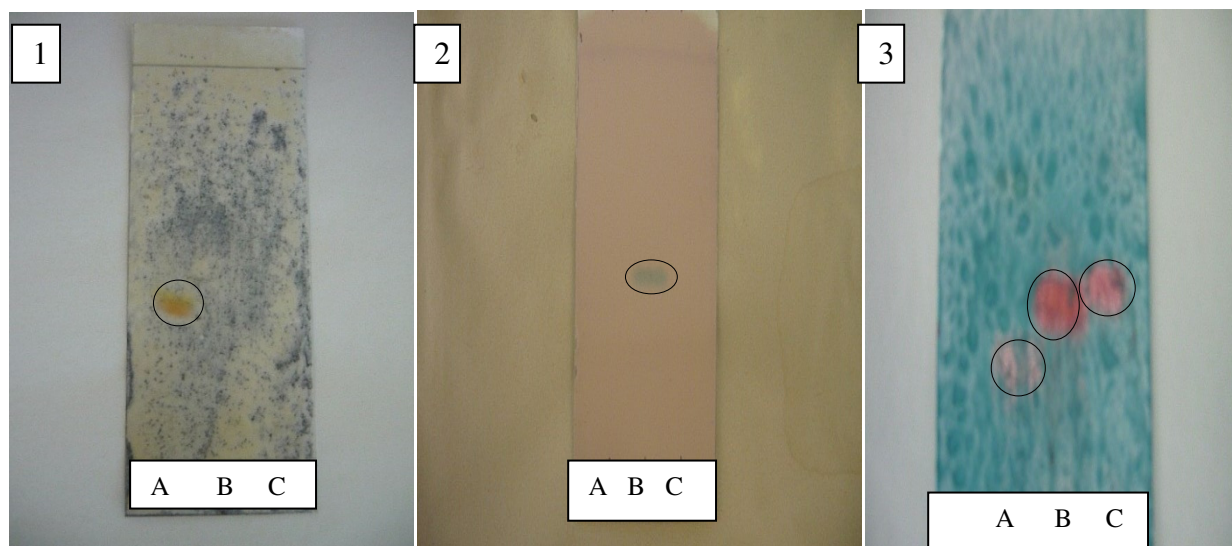


Legenda: 1- Visualização a 254 nm, 2 – Visualização a 366 nm, A – Cumafos, B-Flumetrina, C-Tau-Fluvalinato

Após a observação na câmara de UV/Vis, as cromotofolhas foram aspergidas com os seguintes reagentes: *p*-anisaldeído, solução de 20% KOH em metanol e solução de INT/PMS (10:2, v/v) e dicloreto de paládio. Com o reagente *p*-anisaldeído apenas foi visível a flumetrina, com o reagente de dicloreto de paládio apenas o cumafos, com a solução de 20% KOH em metanol e solução de INT/PMS todos os acaricidas estudados foram visualizados (Figura 10).

Outros reagentes de visualização foram testados, contudo os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que os limites de detecção eram superiores aos obtidos com os reagentes acima referidos.

Figura 10: Colorações das manchas das substâncias estudadas, após pulverização com os reagentes dicloreto de paládio, *p*-anisaldeído e INT/PMS.



Legenda: 1 – Dicloreto de paládio, 2- *p*-anisaldeído, 3 – INT/PMS; A – Cumafos, B- Flumetrina, C-Tau-Fluvalinato.

Na Tabela 23 são apresentados os resultados obtidos quanto ao limite de detecção ($\mu\text{g}/\text{mancha}$), visualização e cor da mancha resultante.

Tabela 23: Parâmetros de identificação dos acaricidas sintéticos estudados em mel.

Acaricida sintético	Luz UV (nm)	Limite de Detecção (µg/mancha)	Reagente de visualização	Cor
Flumetrina	254	0,3	p-anisaldeído	Azul
			INT/PMS	Rosa
			Dicloreto de paladio	Não reagiu
Tau-fluvalinato	254	0,3	p-anisaldeído	Não reagiu
			INT/PMS	Rosa
			Dicloreto de paladio	Não reagiu
Cumafos	366	0,1	p-anisaldeído	Não reagiu
			INT/PMS	Rosa
			Dicloreto de paladio	Amarelo

3.2 - Desenvolvimento da Técnica de Extração em Fase Sólida com detecção/identificação por Cromatografia de Camada Fina

O método proposto teve como objectivo a implementação de uma metodologia de rastreio para determinação de acaricidas em amostras de mel, utilizando o mesmo procedimento de extração.

A optimização desta técnica consistiu em extrair os acaricidas estudados do mel biológico previamente fortificado, de modo a ser utilizada apenas uma metodologia de extração, dado que os acaricidas pertencem a diferentes grupos químicos (piretróides e organofosforados).

A extração foi efectiva para concentrações $\geq 0,1$ µg/g de Cumafos e $\geq 0,3$ µg/g de Tau-fluvalinato e Flumetrina.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 24.

Tabela 24: Parâmetros de validação do método para rastreio de Cumafos, Flumetrina e Tau-fluvalinato em mel.

Acaricida	Concentração (µg/g)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficiência (%)
Cumafos	0,1	90	100	90	100	95
Flumetrina	0,3	90	100	90	100	95
Tau-Fluvalinato	0,3	90	100	90	100	95

O método proposto para rastreio de acaricidas em amostras de mel é sensível, específico e não ocorrem “falsos negativos”, o que é fundamental para método de rastreio. Os resultados obtidos para validação do método de rastreio podem ser explicados pelo facto de terem sido utilizadas

amostras de mel biológico como “branco”, entendendo-se assim que estão isentas de contaminação. Tal pode não ser correcto, uma vez que a presença ou ausência destas substâncias não foi verificada por outro tipo de metodologia. Contudo como se trata de mel biológico a presença de resíduos de acaricidas, utilizadas como medicamentos veterinários, neste tipo de amostras não deverá ocorrer.

3.3 – Detecção e Identificação dos acaricidas estudados por Cromatografia Gasosa

O valor obtido de tempo de retenção (tr) para o cumafos foi de $22,060 \pm 0,5$ min, para a flumetrina de $16,340 \pm 0,5$ min e para o tau-fluvalinato $6,705 \pm 0,5$ min e $17,015 \pm 0,5$ min.

Nas Figuras 11, 12, 13 e 14 são apresentados os perfis cromatográficos para cada um dos acaricidas estudados e para a amostra de mel considerada como branco.

Figura 11: Perfil cromatográfico para amostra de mel considerada como branco.

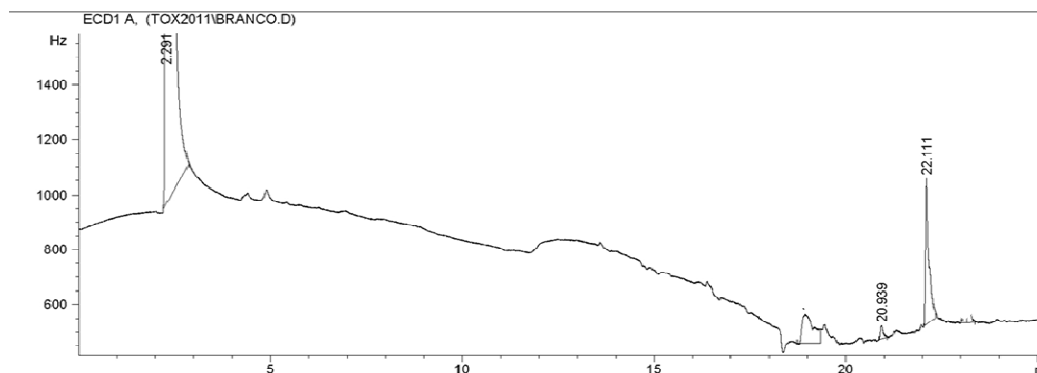


Figura 12: Perfil cromatográfico para o composto o cumafos.

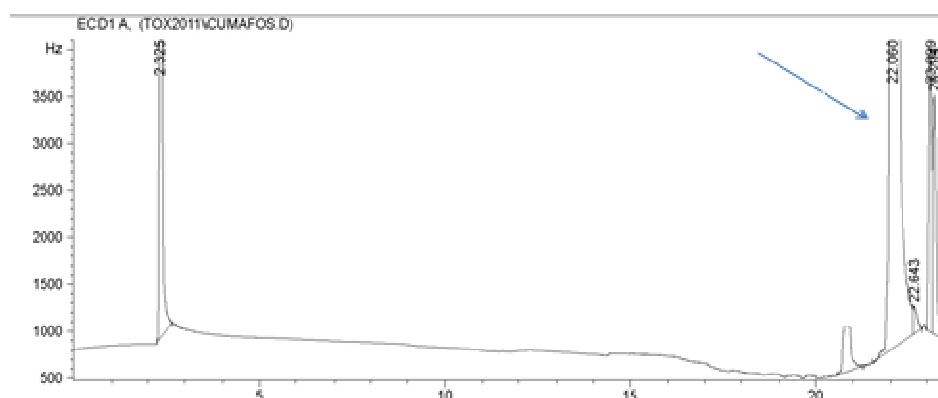


Figura 13: Perfil cromatográfico para o composto flumetrina.

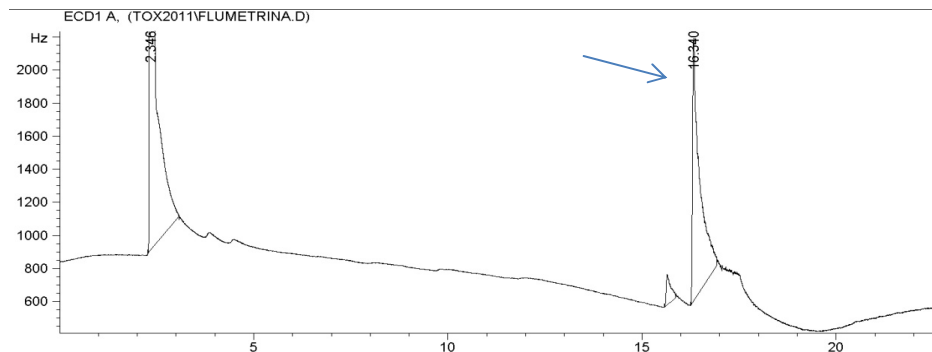
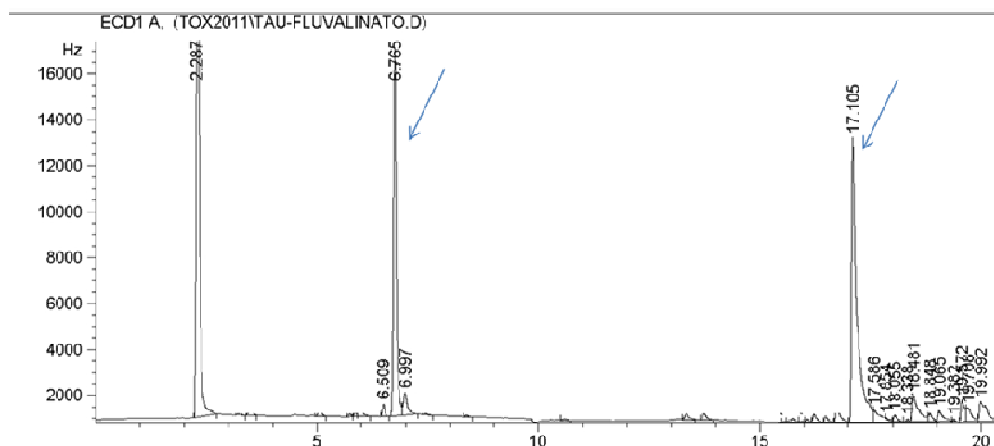


Figura : Perfil cromatográfico o composto tau-fluvalinato



Como se pode verificar cada uma das substâncias apresenta um perfil cromatográfico característico e tempos de retenção diferentes. Assim as condições cromatográficas para detecção e identificação de cumafos, flumetrina e tau-fluvalinato por cromatografia gasosa foram aceites.

3.4 - Detecção/identificação de Tetraciclina e Sulfamidas por Cromatografia de Camada Fina

Como referido a técnica utilizada para a detecção de tetraciclina e sulfamidas nas amostras de mel foi a cromatografia de camada fina.

De modo a escolher os eluentes mais adequados para cada antibiótico, foram realizadas várias combinações para obter uma separação eficiente dos compostos em estudo (Tabela 25).

Tabela 25: Estatística descritiva dos valores de Rf (média, desvio padrão e coeficiente de variação) para cada antibiótico nos diferentes sistemas de eluição ($n=9$)

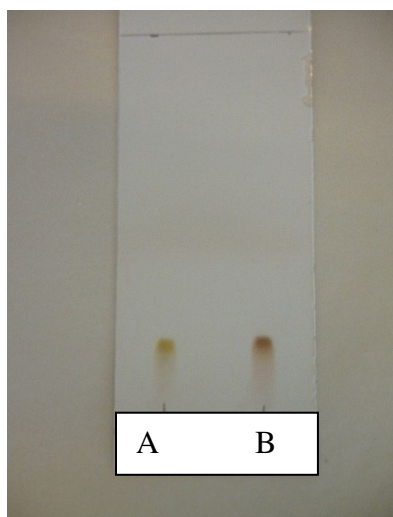
Antibiótico	Sistema de Eluição	Média	DP	CV (%)
Tetraciclina	A	0,22	0,018	8,19
	B	0,39	0,005	1,28
	C	0,15	0	0
Oxitetraciclina	A	0,41	0,005	1,22
	B	0,40	0,005	0,74
	C	0,06	0,002	2,60
Sulfatiazol	D	0,63	0,004	0,67
	E	0,35	0,028	8,19
Sulfametaxazol	D	0,82	0,008	0,99
	E	0,55	0,018	3,34

Legenda: A: n- butanol/ácido acético/ água (30:10:10, v/v/v); B: ácido cítrico (10%) / n-hexano/ etanol (80:10:10, v/v/v); C: Pré-tratamento da placa com EDTA 0.27 M pH 9; clorofórmio/ metanol/ EDTA 5% (65:20:5, v/v/v); D: clorofórmio/metanol (80:20, v/v); E: clorofórmio/metanol (90:10, v/v).

A primeira combinação utilizada para as tetraciclinas foi n-butanol/ácido acético/ água (30:10:10, v/v/v), contudo esta combinação não foi eficaz, pois verificou-se elevada variação entre réplicas do factor de retenção característico para a Tetraciclina, dificuldade das moléculas em saírem do ponto de aplicação, dado a sua polaridade. Verifica-se também que a tetraciclina e a oxitetraciclina presentes numa mesma solução não se separam.

A segunda combinação avaliada foi ácido cítrico (10%) / n-hexano/ etanol (80:10:10, v/v/v), verificou-se novamente uma separação ineficaz para as tetraciclinas em estudo, uma vez que existe sobreposição dos factores de retenção das duas moléculas, como se pode visualizar na Figura 15.

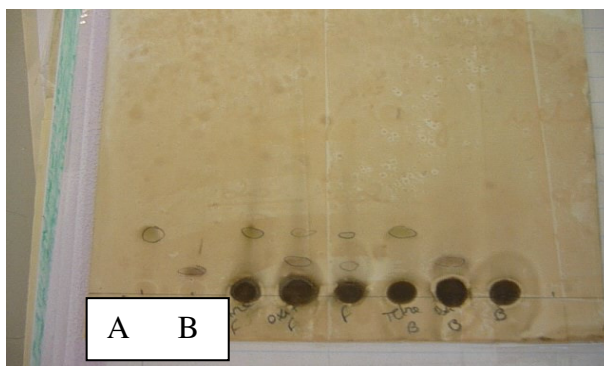
Figura 15: Migração da tetraciclina e oxitetraciclina com a combinação ácido cítrico (10%) / n-hexano/ etanol (80:10:10, v/v/v).



Legenda: A- Tetraciclina, B- Oxitetraciclina

De seguida foi avaliado o sistema de pré-tratamento da placa com EDTA 0,27 M pH 9, seguida de secagem e activação a 110 °C, antes de utilização. Neste caso a fase móvel utilizada consistiu em clorofórmio, metanol e EDTA na proporção de 65:20:5 (v/v/v), com a qual se obteve uma separação eficaz das tetraciclinas, pois não ocorre sobreposição dos factores de retenção das moléculas em estudo (Figura 16), tendo assim este sistema sido escolhido para rastreio de tetraciclinas em mel.

Figura 16: Migração da tetraciclina e oxitetraciclina após pré-tratamento da placa com EDTA 0,27 M pH 9, fase móvel: clorofórmio/ metanol/ EDTA 5% (65:20:5, v/v/v).



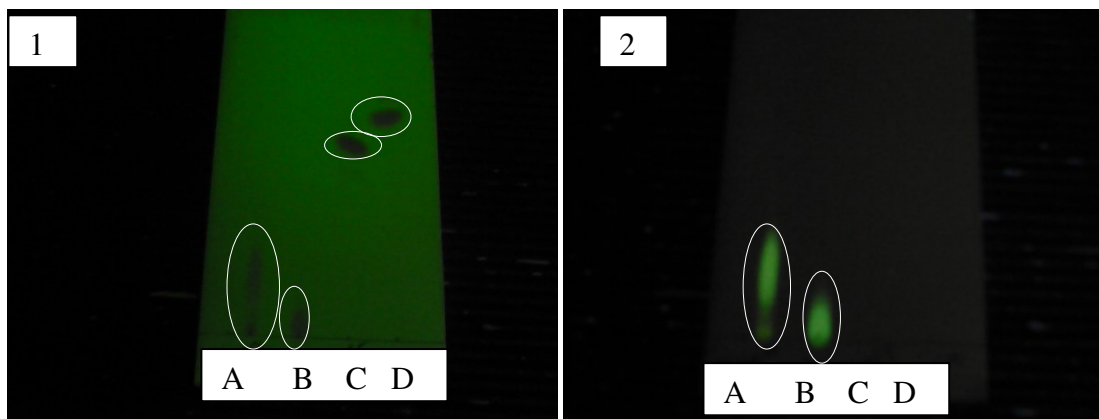
Legenda: A- Tetraciclina, B- Oxitetraciclina.

Para rastreio de sulfamidas foram testados duas combinações de eluentes, indicados na Tabela 23, Dos sistemas de eluição estudados a combinação utilizada foi clorofórmio/ metanol (80:20 (v/v)), a qual permitiu uma separação eficaz das moléculas e baixa variação entre réplicas para determinação do factor de retenção.

Para além da avaliação anterior descrita, foram também avaliados diferentes comprimentos de onda (254 e 366 nm) e diferentes reagentes de visualização, para identificação e confirmação da presença de cada antibiótico.

Após a eluição das placas, estas foram visualizadas na câmara de UV/Vis (254 nm – 366 nm). As tetraciclinas foram visualizadas a 254 e a 366 nm e as sulfamidas a 254 nm. Tendo-se verificado que as tetraciclinas apresentam limites de detecção inferiores a 366 nm. As sulfamidas não são visíveis a 366 nm (Figura 17).

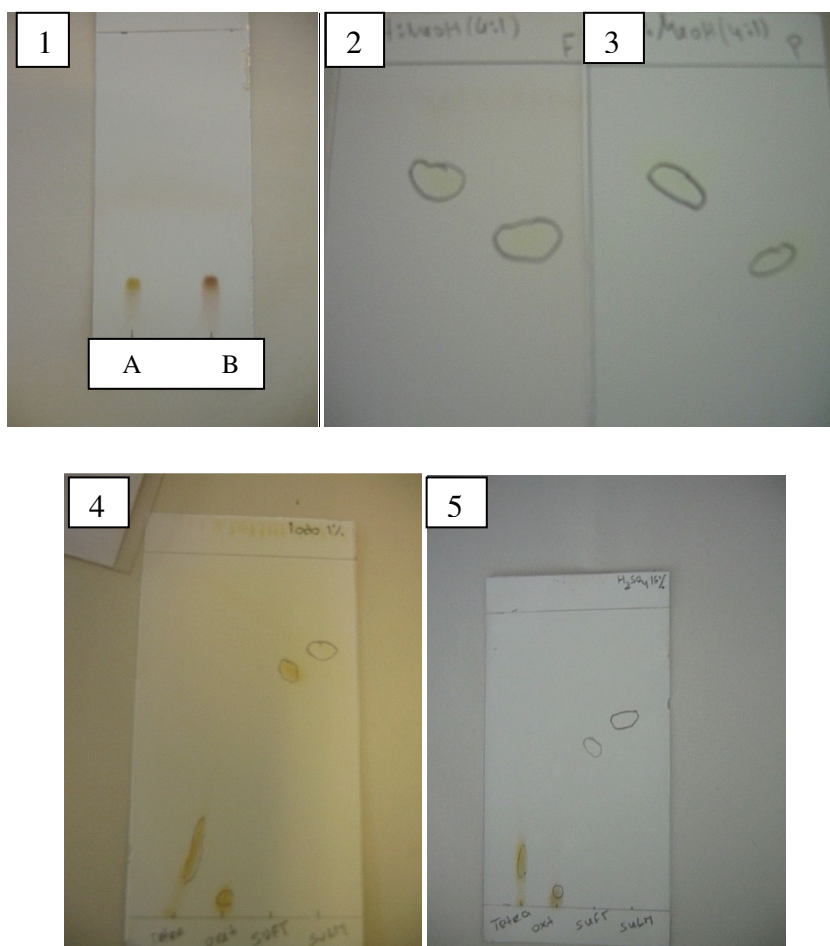
Figura 17: Visualização a 254/366 nm das manchas correspondentemente para as tetraciclinas e sulfamidas estudadas.



Legenda: 1- 254 nm, 2 –366 nm; A- Tetraciclina, B- Oxitetraciclina, C- Sulfatiazol, D- Sulfametoxazole

Depois da observação anterior, as placas foram aspergidas com os seguintes reagentes de visualização: reagente *p*-anisaldeído, iodo 1%, ácido sulfúrico a 16% e fluorescamina. Com o reagente *p*-anisaldeído foram visíveis as tetraciclinas e as sulfamidas; com a solução de ácido sulfúrico apenas as tetraciclinas foram visíveis; com a solução de iodo ambas as famílias foram visualizadas; com a solução de fluorescamina apenas as sulfamidas foram visualizadas (Figura 18).

Figura 18: Colorações obtidas após pulverização com o reagente *p*-anisaldeído, fluorescamina, iodo 1% em etanol e ácido sulfúrico 16%.



Legenda: 1 – Tetraciclina visualizada após pulverização do cromatograma com o reagente *p* – anisalaldeído; A – Tetraciclina, B- Oxitetraciclina; 2 – Sulfamidas visualizadas após pulverização do cromatograma com o reagente fluorescamina; 3 – Sulfamidas visualizadas após pulverização com o reagente *p*-anisaldeído; 4- Tetraciclina e sulfamidas visualizadas após pulverização com Iodo 1% etanol; 5 - Tetraciclina e sulfamidas visualizadas após pulverização com ácido sulfúrico a 16%

Assim foram seleccionados os reagentes de visualização para os antibióticos em estudo. Os limites de detecção para cada antibiótico foram também determinados. Os resultados obtidos para cada antibiótico em termos de limites de detecção ($\mu\text{g}/\text{mancha}$), visualização e cor da mancha encontram-se indicados na Tabela 26.

Tabela 26: Parâmetros de identificação dos antibióticos estudados.

Antibiótico	Luz UV (nm)	Limite de Detecção (µg/mancha)	Reagente de visualização	Cor
Oxitetraciclina	366	0,05	<i>p</i> -anisaldeído	Castanho
			Iodo 1% em etanol	Amarelo
			Ácido sulfúrico (16%)	Castanho
Tetraciclina	366	0,008	<i>p</i> -anisaldeído	Verde
			Iodo	Amarelo
			Ácido sulfúrico (16%)	Castanho
Sulfatiazol	254	0,05	<i>p</i> -anisaldeído	Amarelo
			Iodo 1% em etanol	Amarelo
			Ácido sulfúrico (16%)	Não reagiu
			Fluorescamina	Amarelo
Sulfametaxozole	254	0,05	<i>p</i> -anisaldeído	Amarelo
			Iodo 1% em etanol	Amarelo
			Ácido sulfúrico (16%)	Não reagiu
			Fluorescamina	Amarelo

3.5 - Desenvolvimento da Técnica de Extração em Fase Sólida com detecção/identificação por Cromatografia de Camada Fina.

O método proposto teve como objectivo a implementação de uma metodologia de rastreio para determinação de tetraciclina e sulfamidas em amostras de mel. A optimização desta técnica permitiu extrair os antibióticos estudados do mel previamente fortificado, de modo a ser necessária apenas uma metodologia de extração. Com a técnica de extração em fase sólida anteriormente descrita foi possível extrair as tetraciclina e as sulfamidas em estudo. A extração foi efectiva para concentrações $\geq 0,1 \mu\text{g/g}$ de tetraciclina e oxitetraciclina, $\geq 0,2 \mu\text{g/g}$ de sulfatiazol e $\geq 0,5 \mu\text{g/g}$ de sulfametoxazole.

Assim, o método proposto para rastreio de tetraciclina e sulfamidas em amostras de mel foi validado para os níveis de concentração de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

Os resultados são apresentados na Tabela 27. Como se pode verificar o método proposto para rastreio de tetraciclina em amostras de mel é sensível, específico e não ocorrem falsos negativos, o que é fundamental para este tipo de método.

Tabela 27: Parâmetros de validação do método para rastreio de tetraciclinas e sulfamidas em mel.

Antibiótico	Concentração (µg/g)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)	Eficiência (%)
Oxitetraciclina	0,1	100	100	100	100	100
Tetraciclina	0,1	100	100	100	100	100
Sulfatiazol	0,2	91	100	91	100	95
Sulfametaxazole	0,5	77	100	100	77	87

Contudo a metodologia proposta para rastreio de das sulfonamidas estudadas não é a ideal, uma vez que para metodologias de rastreio os “falsos negativos” devem ser evitados, pois não irão ser posteriormente confirmados por métodos quantitativos. No caso de “falsos positivos” o problema é mínimo, pois o resultado deve ser confirmado por métodos quantitativos. Tal como referido anteriormente, os resultados obtidos para validação do método de rastreio podem ser explicados pela utilização de amostras de mel biológico como “branco”, o qual não foi analisado quanto à presença/ausência destes antibióticos. Contudo como se trata de mel biológico a presença de resíduos destas substâncias activas, utilizadas como medicamentos veterinários neste tipo de amostras não deverá ocorrer.

3.6 - Determinação de resíduos de acaricidas sintéticos e antibióticos em amostras de mel

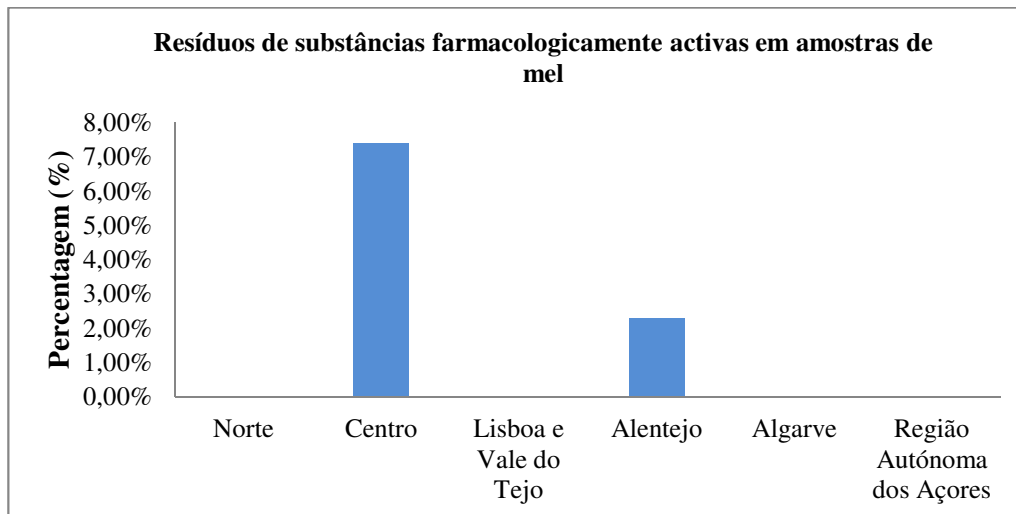
Como referido anteriormente foi estimado um número de amostras, face à produção de mel em 2009, de 115 amostras no total, contudo foram adquiridas 42 amostras das diferentes regiões de Portugal, ou seja foram recolhidas 36,5% das amostras estimadas como necessárias.

Na Tabela 28 e Figura 19 apresentam-se os resultados obtidos para as amostras de mel analisadas por cromatografia de camada fina e cromatografia gasosa para determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas.

Tabela 28: Determinação de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional ($n=42$).

Região Portugal	Número de amostras (n)	Amostras positivas (%)	Composto detectado
Norte	5	0,0%	-----
Centro	12	7,4 %	Sulfatiazol
Lisboa e Vale do Tejo	11	0,0%	-----
Alentejo	6	2,3%	Sulfatiazol
Algarve	5	0,0%	-----
Região Autónoma dos Açores	3	0,0%	-----

Figura 19: Representação gráfica da presença de resíduos de substâncias farmacologicamente activas em amostras de mel nacional ($n=42$).



Nas amostras de mel recolhidas a nível nacional não foram detectados os acaricidas pesquisados (cumafos, flumetrina e tau-fluvalinato), contudo 9,7 % das amostras nacionais são suspeitas para a presença de resíduos de sulfatiazol. Estas deverão ser analisadas por outro tipo de metodologia para confirmação dos resultados, pois o método utilizado é apenas de rastreio.

Em estudos prévios realizados em Portugal entre 2004 e 2007 (*Rastreio Nacional de Antibióticos no mel: Avaliação das Vias de Contaminação dos Resíduos no Mel*), os autores verificaram que os níveis de contaminação do mel nacional por resíduos de sulfonamidas foram significativos, principalmente em relação ao sulfatiazol. Os compostos sulfametizol, sulfamerazina, sulfisoxasol e sulfametoxipiridazina foram encontrados com menor frequência. Pelo contrário, as ocorrências

de resíduos de tetraciclina no mel foram baixos, e a estreptomicina não foi detectada em qualquer amostra de mel nacional (Dias, Peres, Correia & Vilas – Boas, 2008). Em relação a estudos prévios realizados em Portugal não foi encontrada informação acerca de pesquisa de acaricidas sintéticos em amostras de mel.

A presença de resíduos de antibióticos em amostras de mel pode dever-se ao uso de substâncias não autorizadas por parte dos apicultores, contudo para além disto, a presença deste tipo de substâncias no mel podem ser devido a contaminações indirectas, pois as abelhas podem recolher estas substâncias do ambiente.

O facto de não terem sido detectados acaricidas (cumafos, flumetrina e tau-Fluvalinato) nas amostras de mel nas diferentes regiões portuguesas poderá indicar que os apicultores cumprem as boas práticas apícolas. O uso destas substâncias está a diminuir face ao aparecimento dos compostos orgânicos para o controlo da varroa e ao aumento da resistência do ácaro a estas substâncias. Para além do referido, os acaricidas estudados são compostos lipofílicos, podendo a baixa contaminação do mel com estas substâncias dever-se a esta característica. Em estudos realizados por Bogdanov, Kilchenmann & Imdorf (1999) foi determinada a ordem de lipofilicidade destas substâncias, os níveis de acaricidas encontrados nos vários produtos após tratamento diminuíram na ordem seguinte: cera > favos de mel >> alimento (açúcar) ≥ mel, e em termos de lipofilicidade: flumetrina > fluvalinato ≥ cumafos.

Como referido anteriormente o consumo anual de mel em Portugal em 2009/2010 foi de 0,7 kg/habitante, o que indicia um consumo médio de 1,9 g/ habitante/ dia de mel. Contudo o consumo de mel não é homogéneo, dado que nem toda a população consome mel diariamente, nem a quantidade diária de consumo é igual nos 365 dias do ano. De acordo com o estudo realizado por Ribeiro *et al.* (2009), no distrito de Bragança, 94,8% dos inquiridos (n=172) é consumidor de mel, sendo que 34% consome uma vez por semana, 22% uma vez por mês e apenas 17,4% é consumidor de mel diariamente, mas a maior frequência de consumo ocorre nas épocas frias (84,2%). Para o consumidor padrão, definido pela *FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* para efeitos de análise de risco de substâncias químicas em segurança alimentar, é considerado um consumo de 50 g/dia/pessoa. No entanto é necessário que os padrões alimentares de cada país sejam considerados no estabelecimento deste valor, de modo a proteger todos os grupos de consumidores, uma vez que para além do consumo directo do produto, este pode ser ingerido pelo consumo de produtos de confeitaria, panificação e cereais (FAO/WHO,

2010). Considerando que o consumidor ingere diariamente 50 g de mel e tendo em conta os limites de detecção obtidos e o peso corporal do homem padrão (60 kg) pode-se calcular um valor de ingestão diária de 0,083 µg/kg peso corporal para o cumafos, de 0,25 µg/kg peso corporal para flumetrina e tau-fluvalinato e 0,083 µg/kg peso corporal para as tetraciclinas. Comparando com os valores de ingestão diária admissível (IDA), indicados anteriormente na Tabela 12, verifica-se que os valores determinados são inferiores aos valores das IDAs estabelecidas pelas várias entidades reguladoras, o que traduz um risco aceitável para o consumidor. Refira-se no entanto que na Europa a utilização das tetraciclinas como medicamentos veterinários em apicultura estão proibidas (face às diferenças que se verificam na análise de risco entre a EMA e o JECFA), pelo que o mel não deverá conter resíduos destas substâncias.

A avaliação da presença de resíduos de substâncias farmacologicamente activas no mel realizada neste trabalho indica que estas substâncias não representam um risco em termos de segurança alimentar. Contudo o risco poderá não ser negligenciável para o sulfatiozol (substância proibida), uma vez que foram detectados resíduos desta substância activa no mel, provavelmente devido ao uso de medicamentos não autorizados.

Capítulo IV - Conclusão

A nível nacional a capacidade de avaliação da presença de resíduos de medicamentos veterinários no mel é praticamente nula. Face à necessidade de garantir o controlo daquele produto é essencial a disponibilidade de metodologias analíticas específicas, sensíveis, rápidas e relativamente baratas para fornecer aos apicultores garantias da qualidade do mel a ser comercializado, uma vez que o uso excessivo daquelas substâncias, ou a sua má utilização, podem afectar a qualidade do mel e condicionar a sua exportação.

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de metodologias analíticas que permitissem analisar simultaneamente sulfamidas e tetraciclinas; e acaricidas sintéticos em amostras de mel; e aplicação destas metodologias na determinação das referidas substâncias em amostras de mel nacionais.

A análise de resíduos no mel envolve várias etapas, tais como, extracção dos compostos de interesse, eliminação de substâncias interferentes, detecção e/ou identificação do resíduo, quantificação e/ou confirmação. Devido à quantidade de produtos utilizados e à falta de informação do qual ou quais os compostos utilizados, foi fundamental a implementação e desenvolvimento de metodologias de rastreio que permitam simultaneamente a detecção e identificação de diferentes compostos, inclusive de diferentes grupos químicos.

Por algumas limitações, técnicas (equipamento) e temporais para realização deste trabalho, algumas optimizações não foram realizadas em termos de quantificação e/ou confirmação da presença de substâncias farmacologicamente activas em mel, contudo o procedimento analítico proposto para rastreio destas substâncias pela metodologia de extracção em fase sólida (cartuchos C18 Sep Pak) e Cromatografia de Camada Fina em cromotofolhas de sílica gel F_{254 nm}, utilizando diferentes sistemas de eluição e reagentes de visualização para cada grupo químico pode ser utilizado para rastreio de resíduos de substâncias farmacologicamente activas de medicamentos veterinários em mel, dado aos limites de detecção, Rfs, cor e eficiência obtidos.

O estudo desenvolvido permitiu concluir que 9,7% das amostras mel nacionais analisadas ($n=42$) apresentaram-se suspeitas quanto à presença de antibióticos, especificamente o sulfatiazol. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de tetraciclinas nem a presença de acaricidas sintéticos (cumafos, tau-fluvalinato e flumetrina).

O risco decorrente da presença de resíduos de substâncias farmacologicamente activas no mel nacional não é elevado e pode ser facilmente reduzida com controlo veterinário e com aplicações

correctas por parte dos apicultores dos medicamentos autorizados contra as diferentes patologías das abelhas.

Bibliografia

- Adamczyk, S.; Lázaro, R.; Pérez-Arquilué, C.; Bayarri, S.; Herrera, A. (2010). Impact of the Use of Fluvalinate on Different Types of Beeswax from Spanish Hives. *Arch Environ Contam Toxicol.* 58:733–739
- Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J. (2001). Multiresidue determination of pesticides in honey by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of AOAC international*, 84, 4: 1165 – 1171.
- Amoli, J.; Hasan, J.; Hejazy, M. (2009). Determination of Amitraz Residue by Headspace Gas Chromatography in Honey and Beeswax Samples from Iran. *American Journal of Food Technology.* 4: 56-59.
- Applied Separations (2010). Isolation of tetracyclines from honey. Application note. Acedido em Dez, 4, disponível em: www.appliedseparations.com.
- Atienza, J.; Jiménez, J.; Bernal, J.; Martín, M. (1993). Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 655: 95-99
- Bonvehí, J.; Gutiérrez, A. (2008). Residues of antibiotics and sulphonamides in honeys from Basque Country (NE Spain). *Journal Science Food Agruculture* 89: 63-72.
- Bogdanov, S.; Kilchenmann, V.; Imdorf, A. (1999). Acaricide residues in honey, beeswax and propolis. Swiss Bee Research Centre. Acedido em Set, 7, 2011, disponível em: http://californiabeecompany.com/articles/acaricides_e-1.pdf.
- Bogdanov, S. (2003). Current status of analytical methods for the detection of Residues in bee products. *APIACTA* 38: 190-197.
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie* 37:1-18.
- CAMAG (2011). Acedido em Jul. 27, 2011, disponível em: <http://www.camag.com/v/products/assemblies/>.
- Chemicalbook (2011). Acedido em Set. 27, 2011, disponível em: <http://www.chemicalbook.com>.
- Codex Alimentarius (2009). Guidelines for the design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. Acedido em Ago, 22, 2011, disponível em: www.codexalimentarius.net/download/standards/11252/CXG_071e.pdf
- Comissão Europeia (2008a). European Commission Staff Working Document on the implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2006. Acedido em Ago, 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2006_en.pdf

- Comissão Europeia (2008b). European Commission Staff Working Document on the implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2007. Acedido em Ago, 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf
- Comissão Europeia (2010a). European Commission Staff Working Document on the implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2008. Acedido em Ago, 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2008_en.pdf
- Comissão Europeia (2010b). European Commission Staff Working Document on the implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2009. Acedido em Ago, 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2009_en.pdf
- Comissão Europeia (2010). Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu e ao Conselho relativamente à saúde das abelhas. Acedido em Mar. 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bees/docs/honeybee_health_communication_pt.pdf
- Comunidades Europeias (2005). Do campo à mesa, uma alimentação segura para os consumidores europeus. Acedido em Ago. 21, 2011, disponível em: <http://ec.europa.eu/publications/booklets/move/46/pt.pdf>
- Correia, D. (2008). Análise de sulfonamidas no mel: validação e optimização de um método de HPLC-fluorescência. Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar. Bragança: Instituto Politécnico, Escola Superior Agrária.
- Debayle, D.; Guy Dessalces, G.; Grenier - Loustalot, M. (2008). Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 3, 1011-1020.
- Decisão da Comissão nº 97/747/CE, de 27 de Outubro de 1997 que fixa o nível e a frequência de amostragem previstos pela Directiva 96/23/CE do Conselho para a pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos em certos produtos de origem animal. Acedido em Fev, 2011. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31997D0747:PT:HTML>
- Decisão da Comissão nº 98/179/CE, de 23 de Fevereiro de 1998, que estabelece regras para a colheita das amostras oficiais a utilizar na pesquisa de determinadas substâncias e seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L65/31.
- Decisão da Comissão nº 2002/657/CE, de 12 de Agosto de 2002, que dá execução ao disposto na Directiva 96/23/CE do conselho relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L221/8.

- Decreto-lei nº 148/99 de 4 de Maio de 1999. Relativo às medidas de controlo a aplicar a certos subprodutos e aos seus resíduos em animais vivos e respectivos produtos. Diário da República, nº 103, série I-A
- Decreto-lei nº 560/99, de 18 de Dezembro de 1999. Estabelece as regras a que deve obedecer a rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. Diário da República, 293, serie I- A.
- Decreto-lei nº 214/2003, de 18 de Setembro de 2003. Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2001/110/CE, do Conselho, de 20 de Dezembro, relativa ao mel. Diário de república, nº 216, série I- A.
- Decreto-lei nº 185/2005, de 4 de Novembro de 2005. Transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 96/22/CE, do Conselho, de 29 de Abril, relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias beta-agonistas em produção. Acedido em Mar, 7, 2011, disponível em: www.dre.pt.
- Decreto- lei nº 203/2005, de 25 de Novembro de 2005. Estabelece o regime jurídico da actividade apícola e as normas sanitárias para defesa contra as doenças das abelhas. Diário da República, nº 227, série I-A.
- Decreto-Lei nº 1/2007 de 2 de Janeiro de 2007. Estabelece as condições de funcionamento dos locais de extracção e processamento de mel e outros produtos da apicultura destinados ao consumo humano, complementares aos Regulamentos (CE) n.os 852/2004 e 853/2004. Diário da República, nº 1,1ª série.
- Despacho Normativo nº 30/2005 de 6 de Maio. Estabelece as regras complementares de aplicação do Programa Apícola nacional. Diário da República nº 88, série I-B.
- Despacho Normativo nº 23/2008 de 18 de Abril. Estabelece as regras complementares de aplicação do Programa Apícola Nacional. Diário da República, n.º 77,2.ª série.
- Despacho Normativo nº 24/2009 de 3 de Julho. Estabelece alterações às regras complementares de aplicação do Programa Apícola Nacional. Diário da República, n.º 127, 2.ª série.
- Despacho Normativo nº 27/2010 de 24 de Novembro. Estabelece as regras complementares de aplicação do Programa Apícola nacional, nº 228, 2ª Série.
- Dias, L.; Peres, A.; Correia, D.; Vilas-Boas, M. (2008). Qualidade do mel Nacional: Níveis de contaminação de antibióticos em mel de três anos apícolas. Acedido em Fev. 2, 2011, disponível em: <http://www.fnap.pt/projectos.php?m=1>
- Direcção Geral de Veterinária (2011a). Doenças das Abelhas, diagnóstico, tratamento e profilaxia. Acedido em Set, 2, 2011, disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18591&generico=18592&cboui=18592>

Direcção Geral de Veterinária (2011b). Mapa das zonas controladas. Acedido em Ago, 29, 2011, disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18591&generico=18592&cboui=18592>

Directiva 96/22/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias beta-agonistas em produção animal. Jornal Oficial das Comunidades europeias, L 125.

Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, relativa às medidas de controlo a aplicar a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos e que revoga as Directivas 85/358/CEE e 86/469/CEE e as Decisões 89/187/CEE e 91/664/CEE. Jornal Oficial das Comunidades europeias, L 302.

Directiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001. Estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L 311.

Directiva 2001/110/CE do conselho de 20 de Dezembro de 2001. Define o produto Mel, e é de transcrição obrigatória para a ordem jurídica nacional, o que veio a acontecer com o Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro. Jornal Oficial das comunidades europeias. L10/47-51.

Directiva 2003/74/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro. Relativa à proibição de utilização de certas substâncias com efeitos hormonais ou tireostáticos e de substâncias β -agonistas em produção animal. Jornal Oficial da União Europeia, L262/17.

Directiva 2004/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 31 de Março. Estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos veterinários. Jornal Oficial da União Europeia, L136.

Directiva 2006/130/CE da Comissão de 11 de Dezembro de 2006, Aplica a Directiva 2001/82/CE do Parlamento Europeu e do Conselho no que respeita ao estabelecimento de critérios de isenção de receita veterinária para determinados medicamentos veterinários para animais produtores de alimentos. Jornal Oficial da União Europeia, L 349.

EMA (2011). VICH GL49: Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies. Acedido em Ago. 2, 2011, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/04/WC500105053.pdf

European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (1995). Committee for Veterinary Medicinal Products. Tau-Fluvalinate Revised Summary Report. . Acedido em Jan. 3, 2011, disponível em: http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015449.pdf

- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (1998). Flumethrin – Summary Report. EMA/MRL/469. Acedido em Dez. 4, 2010, disponível em: <http://www.eudra.org/ema.html>
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) (2001). Committee for Veterinary Medicinal Products. Coumafos. Summary report 2. EMA/MRL/769/00 Final. Acedido em Out. 30, 2011, disponível em: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500013015.pdf
- Eurachem working group (1998). The fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem guide.
- Europa (2011). Europa- Animal Health & Welfare- Live Animals – Beekeeping and Honey product. Acedido em Jun. 20, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/animal/liveanimals/bees/residues_honey_en.htm
- FAO/WHO (2009). Residue evaluation of certain veterinary drugs. Summary report of the seventieth meeting of JECFA. Acedido em Ago.22, 2011, disponível em: http://www.fao.org/ag/agn/agns/jecfa/JECFA70_Summary_report_final_corr.pdf
- FAO/WHO (2010). Discussion paper on veterinary drugs in honey production. Acedido em Ago.22, 2011, disponível em: ftp://ftp.fao.org/codex/ccrvdf19/rv19_10e.pdf
- Federação Nacional dos Apicultores de Portugal (FNAP) (2008). Zonas controladas, sanidade apícola, uma responsabilidade de todos. Acedido em Nov. 22, 2010, disponível em: <http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/sustentabilidad/43.pdf>
- Garcia, M.; Fernández, M.; Herrero, C.; Melgar, M. (1996). Acaricide residue determination in honey. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 56, 881-887.
- Gunes, M.; Gunes, N.; Cibik, R. (2009). Oxytetracycline and Sulphonamide residues analysis of honey samples from Southern marmara region in turkey. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 15, 2, 163 -167.
- Gomis, D.; Mangas, J.; Castaño, A.; Gutiérrez, M. (1996). Determination of Acaricides in Honey by Liquid Chromatography with Ordinary, Narrow-Bore and Microbore Columns. Analytical Chemistry, vol. 68, nº 21, 3867-3870.
- Gupta, S.; Handa, S.; Sharma, K. (1998). A new spray reagent for the detection of synthetic pyrethroids containing a nitrile group on thin-layer plates. Talanta, 45, 1111 – 1114.
- Hong, J.; Jung, O.; Ryoo, J.; Hong, J. (2009). Determination of acaricides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. Bulletin Korea Chemistry Society, 30,1 , 61-65.
- INSA (2006). Tabela de Composição de Alimentos, Ed. Centro de segurança Alimentar e Nutrição Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (*ICH*). Acedido em Jan, 7, 2011, disponível em: <http://www.ich.org/>
- Instituto de Financiamento da Agricultura e Pescas (IFAP) (2011). Programa Apícola Nacional. Acedido em Set. 3, 2011, disponível em: http://www.ifap.min-agricultura.pt/portal/page/portal/ifap_publico/GC_ajudas/GC_animais/GC_mel_R
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2009). Agricultural Statistics – 2008. Acedido em Ago. 24, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=72155042&PUBLICACOESmodo=2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2010). Agricultural Statistics - 2009. Acedido em Mar.11, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=94562689&PUBLICACOESmodo=2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2011a). Human consumption of honey per capita (kg/inhab.); Annual. Acedido em Mar. 11, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000202&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2011b). Human consumption of honey (t); Annual. Acedido em Mar. 11, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000201&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2011c). Honey – Statistics Portugal. Acedido em Ago. 25, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000924&contexto=bd&selTab=tab2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2011d). Estatísticas Agrícolas 2009. Acedido em Mar. 11, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=94562689&PUBLICACOESmodo=2
- Instituto Nacional de Estatística (INE) (2011e). Estatísticas Agrícolas 2010. Acedido em Ago. 25, 2011, disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=123298334&PUBLICACOESmodo=2
- Instituto Português da Qualidade (2000). Norma Portuguesa NP EN ISO/IEC 17025: 2000, relativa aos requisitos gerais para Laboratórios de ensaio e calibração.

- Instituto Português da Qualidade. (2004). Norma Portuguesa NP EN ISO/IEC 17025. Guia para acreditação de laboratórios.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Acedido em Mar. 23, 2011, disponível em: <http://www.iupac.org/>
- Jansson, C. (2000). Multiresidue method for the gas chromatography determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup. *Journal of AOAC international*, 83, 3, 714-719.
- Jornet, D.; González-Martínez, M.; Puchades, R.; Maquiera, A. (2010). Antibiotic immunosensing: Determination of sulfathiazole in water and honey. *Talanta* 81, 1585-1592.
- Kay, J.; Arnold, D. & Ellis, R. (2009). Residues of veterinary drugs in honey and possible approaches to derive MRLs for this commodity. Acedido em 22 Agosto, 2011, disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0659e/i0659e01.pdf>
- Kamel, A.; Al-Ghamdi, A. (2006). Determination of acaricide residues in Saudi Arabian Honey and Beeswax using solid phase extraction and gas chromatography. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 41, 159-165.
- Knupp, G.; Pollmann, H.; Jonas, D. (1986). An Improved HPTLC method for the rapid identification and quantification of sulphonamides. *Chromatographia*, vol. 22, 21-24.
- Korta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, LA.; Gallo, B.; Vicente, F.; Kilchenmann, V.; Bogdanov, S. (2001). Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12), 5835–5842.
- Korta, E.; Bakkali, A.; Berrueta, L.; Gallo, B.; Vicente, F.; Bogdanov, S. (2003). Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. *Analytica Chimica Acta* 475, 97, 97 – 103.
- Krivohlavek, A.; Smit, Z.; Bastinac, M.; Zuntar, I.; Plavsic, F. (2005). The determination of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry method (LC/MS). *Journal Sep.Sci*, 28, 1434 – 1439.
- Kujawski, M.; Namiesnik. J. (2008). Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues. *Trends in Analytical Chemistry*, vol. 27, nº 9: 785-793.
- Lopez, M.; Pettis, J.; Smith, B.; Chu, P-S. (2008). Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1553-1559.
- Maia, M. (2008). Os Antibióticos no Mel. Acedido em Jul. 27, 2011, disponível em: <http://www.oapicultor.com>

- Maggi, M.D.; Ruffinengo, S.R.; Damiani, N.; Sardella, N.H.; Eguaras, M.J. (2009). First detection of *Varroa destructor* resistance to coumaphos in Argentina. *Exp AAI. Acarol.* 47: 317-320.
- Martel, A.; Zeggane, S. (2002). Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 954, 173- 180.
- Martel, A.; Zeggane, S.; Aurieres, C.; Drajnudel, P.; Faucon, J.; Aubert, M. (2007). Acaricide residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol_50. *Apidologie*, 38: 534-544.
- Maudens, K.; Zhang, GF; Lambert, W. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high- performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of chromatography A*, 1047, 85-92.
- Menkissoglu-Spiroudi, U.; Tsigouri, A.; Diamantidis, G.; Thrasyvoulou, A. (2001). Residues in honey and beeswax caused by beekeeping treatments. *Fresenius Environmental Bulletin*, 10, 5, 445-450.
- Munstedt, T.; Rademacher, E.; Petz, M. (2005). HPLC, Charm II and ELISA: Advantages and disadvantages for the analysis of tetracyclines in honey. *Apiacta* 40, 5-9.
- Oka, H.; Ito, Y.; Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of chromatography A*, 882, 109-133.
- PAN 2008-2010. Programa Apícola Nacional Triénio de 2008-2010. (2007). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Acedido em Dez. 6, 2010, disponível em: <http://www.fnap.pt/papicula.php?m=5>
- PAN 2011-2013 - Programa Apícola Nacional Triénio de 2011-2013. (2010). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Acedido em Dez. 6, 2010, disponível em: www.fnap.pt/papicula.php?m=3.
- Pang, G.F.; Cao, Y.Z.; Zhang, C.L.; Li, X.M.; Jia, Z.Y. (2003). Liquid chromatography – fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. *Anal Bioanal Chem*, 376, 534 – 541.
- Paschoal, J.; Rath, S. (2008). Validação de métodos cromatográficos para determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Química Nova*, vol 31, nº 5, 1190-1198.
- Passão, H. (2010). Panorâmica do Sector Apícola. Material disponibilizado no âmbito do Mestrado de Segurança Alimentar.

- Pena, A.; Pelantova, N.; Lino, C.; Silveira, N.; Solich, P. (2005). Validation of an Analytical Methodology for Determination of Oxytetracycline and Tetracycline Residues in Honey by HPLC with Fluorescence Detection. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3784-3788.
- Peres, G.; Airoidi, F.; Reyes, F. (2007). Medicamentos veterinários na apicultura: metodologias analíticas para determinação de resíduos no mel. *Revista Brasileira de Toxicologia* 20, nº1 e 2, 21-27.
- Picó, Y; Fernández, M.; Ruiz, M.; Font, G. (2007). Current trends in solid-phase- based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70, 117 – 131.
- Piro, R.; Mutinelli, F. (2003). The EU Legislation for honey residue control. *APIACTA*, 38, 15 - 20.
- Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) (2008) Resultados (2008). Acedido em Ago. 25, 2011, disponível em: http://www.dgv.min/agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório_resultados2008.pdf.
- Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) (2011) - Relatórios Anuais. Acedido em Ago. 25, 2011, disponível em: <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/>
- Portaria nº 699/2008 de 29 de Julho, regulamenta as derrogações previstas no Regulamento (CE) n.º 853/2004, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril, e no Regulamento (CE) n.º 2073/2005, da Comissão, de 15 de Novembro, para determinados géneros alimentícios. *Diário da República*, 1.ª série n.º 145.
- Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Niedzielska, J.; Sniegocki, T.; Grzebalska, A. (2003). Sulfonamide residues in honey. Control and development of analytical Procedure. *APIACTA*, 38, 249 - 256.
- Posyniak, A.; Sniegocki, T.; Zmudzki, J. (2002). Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamides residues in honey. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 46, 111-117.
- Programa Sanitário Apícola (PSA) (2011). Direcção Geral de Veterinária. Acedido em Ago. 29, 2011, disponível em <http://www.dgv.min-agricultura.pt/portal/page/portal/DGV/genericos?actualmenu=18591&generico=18592&c boui=18592>
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2005). Annual Report. European Commission. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2006). Annual Report. European Commission. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2007). Annual Report. European Commission. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2007_en.pdf

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2008). Annual Report. European Commission. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2009). Annual Report. European Commission. Acedido em Fev. 15, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2009_en.pdf

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2010). Annual Report. European Commission. Acedido em Nov. 22, 2011, disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf

Regulamento (CEE) n.º 2377/90 do Conselho de 26 de Junho de 1990, que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia, L 224, 1-8

Regulamento n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Jornal Oficial das Comunidades Europeias, L31, 1-9

Regulamento (CE) n.º 797/2004 do Conselho de 26 de Abril de 2004, relativo a acções de melhoria das condições de produção e comercialização de produtos da apicultura. Jornal Oficial da União Europeia, L125.

Regulamento (CE) n.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios. Jornal Oficial da União Europeia, L139, Anexo I.

Regulamento (CE) n.º 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia, L 226.

Regulamento (CE) n.º 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Maio. Prevê procedimentos comunitários para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de substâncias farmacologicamente activas nos alimentos de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia, L152.

Regulamento n.º 37/2010 da comissão de 22 de Dezembro de 2009, relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. Jornal Oficial da União Europeia, L15 de 20.01.2010, 1-72.

- Reybroek, W. (2003). Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian Market. *APIACTA* 38, 23-30.
- Reybroeck, W.; Daeseleire, E.; Ooghe, S.; Jacobs, F. (2004). Sulpha drugs in honey and other bee products. Abstract Apimondia Symposium 2004 "Prevention of residues in honey 2", Celle, Germany, April 27-28, 2004.
- Rezic, I.; Horvat, A.; Babic, S.; Kastelan-Macan, M. (2005). Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, 477-481.
- Rial-Otero, R.; Gaspar, E.M.; Moura, I.; Capelo, J.L. (2007). Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71, 503- 514.
- Ribeiro, M., Matos, A., Almeida, A., Fonseca, A., Fernandes, B., Mota, C., Gonçalves, E., Garcia, E., Pereira, E., Garção, H., Guedes, H., Rodrigues, M., Neto, M., Abreu, R. (2009). Produtos alimentares tradicionais: hábitos de compra e consumo do mel. *Revista de Ciências Agrárias*. Acedido em Fev. 3. 2011, disponível em: <http://www.scielo.oces.mctes.pt>.
- Rodrigues, A.L.; São Braz, B.; Abreu, S.; Correia, M.I; Silva, A.J. (2006). Analytical screening methods for antibiotics detection in Milk [abstract]. Proceedings of the 5 th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residues Analysis, Antwerp, Belgium, 16 - 19 May, pp 195.
- Ryoo, J.J.; Kim, S.H.; Jeong, Y.H; Do, H.-S.; Ryu, J.E.; Kwon, H.Y.; Jeong, J.Y.; Park, H.J.; Lee, S.H.; Hong, M.K. (2008). Simultaneous determination of Amitraz, Bromopropylate, Coumaphos, Cymiazole and 2,4 -Dimethylaniline in Korean Honey samples by High-Performance Liquid Chromatography. *Bull. Korean Chem. Soc*, 28, 5, 1043-1047.
- Sabatini, A.; Carpana, E.; Serra, G.; Colombo, R. (2003). Presence of Acaricides and Antibiotics in samples of Italian honey. *Apiacta* 1.
- Saridaki-Papakonstadinou, M.; Andredakis, S.; Burriel, A.; Tsachev, I. (2006). Determination of tetracyclines residues in Greek honey. *Trakia Journal of Sciences*, 4, 1, 33-36.
- Sherma, J. (2009). Review of advances in the thin layer chromatography of pesticides: 2006-2008. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44, 193-203.
- Tajick, M.; Sohreh, B. (2006). Detection of Antibiotics in chicken meat using TLC. *International Journal of Poultry Science* 5, 7, 611-612.
- Taverniers, I.; Loose, M.; Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 8, 535-552.
- Thompson, H.; Ball, R., Brown, M.; Bew, M. (2003). *Varroa destructor* resistance to pyrethroid treatments in the United Kingdom. *Bull Insectology* 56, 1, 175-181.

- Tsigouri, A.; Menkissoglu-Spiroud, U.; Thrasyvoulou, A. (2001). Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science*, 57, 5, 467–471.
- Tsigouri, A.; Menkissoglu-Spiroud, U.; Thrasyvoulou, A.; Diamantidis, G. (2004). Fluvalinate residues in honey and beeswax after different colony treatments . *Bull. Environ.Contam. Toxicol.* 72:975-982.
- Tolrá, F.; Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Review. Trends in Food Science & Technology* 17, 482-489.
- United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. (2009). Automated Robotic Extyraction/ TLC Analysis for Sulfonamide Residues in Animal Tissues, Eggs and Egg Products. Revision 4, 1-18.
- Vidal, J.; Aguilera-Luiz, M.; Romero-González, R.; Frenich, A. (2009). Multiclass Análisis of Antibiotics Residues in Honey by Ultraperformance Liqui Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1760-1767.
- Xie, H.; Dong, C.; Fen, Y.; Liu, C. (1997). Determination of Doxycyline, Tetracycline and Oxytetracycline simultaneously by TLC – fluorescence scanning densitometry. *Analytical letters*, 30, 1, 79-90.
- Wang, S.; Zhang, Y.; Wang, L.; Duan, Z.; Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives and Contaminants*, 23 (4), 362-384.
- Zhou, J.; Xue, X.; Zhang, J.; Chen, L.; Zhao, J. (2007). Rapid and sensitive determination of two degradation products of flumethrin in honey by ultrasonically assisted extraction and gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Separation Science*, 30, 1912-1919.

Anexo I – Poster apresentado no 5 °Congresso de Ciências Veterinárias, 13-15 de Outubro de 2011, Santarém.

Rastreo de substâncias farmacológicas em mel de abelha *Apis mellifera*. Resultados preliminares.

Pharmacological substances screening in honey *Apis mellifera* bee. Preliminary results.

Belas, A., Carrapiço, B., Vaz, Y., São Braz, B.

Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa, Portugal

Na Apicultura o uso de antibióticos e de acaricidas sintéticos é uma prática corrente, para o tratamento de doenças bacterianas e parasitoses, da qual pode resultar a presença de resíduos no mel. A nível nacional a oferta de metodologias analíticas para avaliação da presença dessas substâncias, no mel, é praticamente nula. Face à necessidade de garantir o controlo daquele produto é essencial a disponibilidade de metodologias analíticas específicas, sensíveis, rápidas e relativamente baratas para fornecer aos apicultores garantia de qualidade do mel a ser comercializado. Isto porque o uso excessivo daquelas substâncias, ou a sua má utilização, podem afectar a qualidade do mel, e condicionar a sua exportação. Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de metodologias de rastreio para determinação de acaricidas sintéticos (cumafos, tau-fluvalinato e flumetrina) e de antibióticos pertencentes aos grupos das sulfamidas e das tetraciclinas em mel.

As metodologias analíticas desenvolvidas envolveram uma fase inicial de extracção em fase sólida (cartuchos C18 Sep Pak), seguida de análise por cromatografia de camada fina em placas ou cromotofolhas de sílica gel F_{254 nm} utilizando diferentes sistemas de eluição e reagentes de visualização para cada grupo químico.

Para separação de sulfamidas utilizou-se uma fase móvel de clorofórmio/ metanol (45:5 (v/v)). Já para a separação de tetraciclinas realizou-se pré tratamento das placas com EDTA 0.27 M, pH 9, seguida de secagem e activação a 110°C, antes de utilização. Neste caso a fase móvel utilizada consistiu em clorofórmio, metanol e EDTA na proporção de 65:20:5 (v/v/v). Para separação dos acaricidas sintéticos utilizou-se fase móvel de n - hexano e acetona na proporção 80:20 (v/v).

A detecção foi realizada com luz UV (254/366 nm) e posterior confirmação por pulverização das placas com os seguintes reagentes: solução de 20% KOH em metanol e solução de INT/PMS

(10:2, v/v) para revelação dos acaricidas, solução de *p* – anisaldeído para revelação de flumetrina e tetraciclina e fluorescamina para revelação de sulfamidas.

As metodologias referidas permitiram detectar os antibióticos e os acaricidas estudados no intervalo de concentrações de 8 – 50 ng e 0,1 – 0,3 µg. Estes limites de detecção, juntamente com os Rfs e cor obtidos, permitem que o procedimento analítico proposto possa ser utilizado para rastreio de resíduos de substâncias farmacologicamente activas de medicamentos veterinários em mel.