



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETECÇÃO DE CONTAMINANTES NO MEL

Conceição Maria Vieira de Brito Almeida

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Dr<sup>a</sup>. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

2010  
LISBOA

---



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

DETECÇÃO DE CONTAMINANTES NO MEL

Conceição Maria Vieira de Brito Almeida

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutora Yolanda Maria Vaz

Dr<sup>a</sup>. Belmira Maria Monteiro Carrapiço

ORIENTADORA

Doutora Yolanda Maria Vaz

2010

LISBOA

---

## **Agradecimentos**

Agradeço à minha família, pais e irmãos, pelo incondicional apoio que me deram durante todo o curso de Mestrado.

Agradeço à Professora Yolanda Vaz, pela sua disponibilidade na orientação deste trabalho, à Doutora Belmira Carrapiço pela forma sempre positiva como orientou o trabalho no laboratório de Toxicologia e à Professora Maria João Fraqueza, pelo apoio no trabalho de microbiologia alimentar.

Agradeço à Eng. Adriana Belas e à Senhora D. Paula Miguel, do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Clínica e à Senhora D. Helena Fernandes e Eng. Maria José Fernandes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, pela inestimável ajuda prestada nos trabalhos desenvolvidos.

Agradeço aos Professores do Mestrado em Segurança Alimentar e a todos os meus Professores.

Agradeço a todos os colegas que me apoiaram e acompanharam durante estes últimos anos.

## Resumo

A produção de mel em Portugal tem sido, geralmente, encarada como uma actividade de lazer, ainda que ultimamente tenham aparecido apicultores que se dedicam de forma profissional à apicultura possuindo já um número elevado de colmeias.

A instalação que se vem verificando de uma situação do colapso das abelhas (desaparecimento das abelhas da colmeia) e a ameaça que poderá representar para a agricultura no que respeita à polinização, constituem uma preocupação a nível mundial.

A preocupação dos consumidores no que respeita à segurança alimentar, particularmente relacionada com a presença quer de contaminantes químicos como microbiológicos esteve na base do desenvolvimento deste trabalho.

Foi desenvolvido um processo de extracção para permitir que a Cromatografia de Camada Fina fosse usada como metodologia de rastreio de pesticidas no mel. Deveria ter sido possível detectar Amitraz ao nível de 0,2 µg/g (LMR 200 µg/kg), Cumafos 0,1 µg/g (LMR 100 µg/kg), Lindano e Metiocarbe 0,00001 µg/g (LMR 0,01 µg/kg) e então confirmar com uma técnica quantitativa. Mas o limite de detecção atingido não se conseguiu aproximar dos valores do Limite Máximo de Resíduo (LMR), sendo necessário prosseguir esta linha de investigação.

Caracterizou-se a oferta de mel, enunciando que tipos de méis estão à disposição do consumidor no mercado da região de Lisboa.

Analisou-se a rotulagem das embalagens de mel, com a finalidade de observar se a informação fornecida ao consumidor cumpria os requisitos legais. Do conjunto 27% das embalagens apresentaram-se como não conformes.

O procedimento de extracção desenvolvido foi aplicado em 23 amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa. Procedeu-se também à análise microbiológica das mesmas amostras.

Os contaminantes químicos pesquisados foram o lindano, cumafos, metiocarbe sulfóxido e amitraz, pois são utilizados pelos apicultores ou persistem no ambiente e têm sido detectados no mel. Detectou-se pesticidas em 5 das 23 amostras.

Em relação aos contaminantes microbiológicos foi pesquisada a presença de *Salmonella* e de esporos de clostrídeos sulfito-redutores e efectuou-se a contagem de bolores e leveduras. Não foram detectados quaisquer dos microrganismos analisados em nenhuma das amostras de mel. Conclui-se que as amostras de mel analisadas apresentaram, uma elevada qualidade microbiológica.

**Palavras-chave:** mel, contaminantes, TLC, pesticidas, qualidade microbiológica

## Abstract

Honey production in Portugal has been, usually, faced as a leisure activity, although lately there have appeared beekeepers that are devoted from a professional way to the beekeeping, already possessing a high number of beehives.

The installation of a situation of the collapse of the bees (disappearance of the bees of the beehive) and the threat that can act for the agriculture in what respects to the pollination constitute a concern at world level.

The consumers' concern in what respects to the alimentary safety, particularly related with the presence of chemical pollutants as microbiologic was in the base of the development of this work.

A process for the extraction of pesticides from honey matrix to be used in Thin-Layer Chromatography (TLC) was developed. This work aimed at detecting the following levels of contaminants: Amitraz at the level of 0.2 µg/g (LMR 200 µg/kg), Cumafos 0.1 µg/g (LMR 100 µg/kg), Lindano and Metiocarbe 0.00001 µg/g (LMR 0.01 µg/kg) and then to confirm with a quantitative method. The expected detection limits could not be achieved with the developed technique, requiring further research.

The honey offer was characterized, enunciating that types of honeys are to the consumer's disposition in the market of the area of Lisbon.

The labeling of the honey was analyzed, with the purpose of observing the information supplied the consumer accomplished the legal requirements. Of the group 27% of the labeling they came as you don't conform.

The procedure of developed extraction and microbiological analysis was applied in 23 honey samples purchased in the market of the area of Lisbon.

The researched chemical pollutants were the lindane, coumaphos, methiocarb sulfoxide and amitraz, because they are used by the beekeepers or they persist in the atmosphere and they have been detected in the honey. It was detected pesticides in 5 of the 23 samples.

In relation to the microbiologic pollutants the presence of *Salmonella* was researched and of *Clostridium* spores and counting of moulds and yeasts. Any of the microorganisms were not detected analyzed in none of the honey samples. We conclude that the honey samples analyzed presented had a high microbiologic quality.

Keywords: honey, pollutants, TLC, pesticides, microbiologic quality

## Índice

Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas .....	ix
<b>Capítulo I: Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Objectivos .....	1
1.2. História do mel através dos tempos .....	2
1.3. Caracterização do mel .....	5
1.3.1. Definição .....	5
1.3.2. Composição do mel.....	5
1.3.3. Propriedades do mel – actividade antioxidante e actividade antimicrobiana.....	10
1.3.4. Mel como alimento e outros usos .....	10
1.4. Produção de mel.....	12
1.4.1. Produção no Mundo e na UE .....	12
1.4.2. Produção de mel em Portugal .....	19
1.5. Informação ao consumidor – rótulo, o que deve constar .....	23
1.6. Legislação referente ao mel .....	25
1.7. Contaminantes do mel .....	27
1.7.1. Contaminantes de natureza química .....	27
1.7.1.1. Metais pesados .....	27
1.7.1.2. Radioactividade .....	28
1.7.1.3. PCB's – contaminantes orgânicos .....	29
1.7.1.4. Pesticidas usados na agricultura .....	29
1.7.1.5. Contaminantes provenientes das práticas apícolas .....	33
1.7.2. Contaminantes microbiológicos.....	34
1.7.3. Detecção de contaminantes .....	38
1.7.3.1. Detecção de resíduos de pesticidas no mel.....	38
1.7.3.2. Avaliação microbiológica do mel.....	42
<b>Capítulo II: Implementação da metodologia de extracção e detecção de pesticidas no mel por cromatografia de camada fina.....</b>	<b>44</b>
2.1. Objectivos .....	44
2.2. Materiais e métodos.....	44
2.2.1. Reagentes e soluções .....	44
2.2.2. Padrões de pesticidas .....	44

2.2.3. Determinação do factor de retenção (RF) e do limite de detecção (LD) para cada um dos pesticidas .....	45
2.2.3.1. Preparação das soluções padrão .....	45
2.2.3.2. Procedimento de cromatografia de camada fina.....	45
2.2.3.3. Eluição na câmara de cromatografia .....	46
2.2.3.4. Preparação dos reagentes de revelação .....	46
2.2.3.5. Visualização da cor das manchas desenvolvidas para cada pesticida.....	47
2.2.3.6. Cálculo do factor de retenção (Rf) para cada pesticida.....	47
2.2.3.7. Determinação dos limites de detecção para cada pesticida.....	47
2.2.4. Procedimentos de extracção e detecção em amostras fortificadas .....	48
2.2.4.1. Procedimento de Extracção para Lindano (OC), Cumafos (OF), Metiocarbe (C).....	48
2.2.4.2. Procedimento de Extracção para Amitraz (Formamidina).....	48
2.2.4.3. Detecção dos resíduos de pesticidas nas amostras de mel fortificadas por cromatografia de camada fina .....	49
2.3. Resultados e discussão .....	49
2.3.1. Determinação do factor de retenção (Rf) de Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz em cromatografia de camada fina. ....	49
2.3.2. Determinação do limite de detecção (LD) para Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz em cromatografia de camada fina .....	52
2.3.3. Resultados da extracção de pesticidas em amostras fortificadas em cromatografia de camada fina.....	53
<b>Capítulo III: Caracterização da oferta de mel e conformidade de rotulagem .....</b>	<b>54</b>
3.1. Objectivos .....	54
3.2. Materiais e métodos.....	54
3.3. Resultados .....	54
<b>Capítulo IV: Contaminantes químicos e microbiológicos em mel adquirido no mercado de Lisboa.....</b>	<b>57</b>
4.1. Objectivos .....	57
4.2. Materiais e métodos.....	57
4.2.1. Origem das amostras .....	57
4.2.2. Procedimentos de extracção e detecção de pesticidas em amostras de mel adquirido no mercado da região de Lisboa.....	57
4.2.2.1. Extracção de pesticidas em amostras de mel adquirido no mercado de Lisboa .....	57
4.2.2.2. Detecção de pesticidas nas amostras de mel adquirido no mercado da região de Lisboa por cromatografia de camada fina.....	58

4.2.3. Análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa.....	58
4.2.3.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	58
4.2.3.2. Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores.....	59
4.2.3.3. Contagem de bolores e leveduras.....	59
4.3. Resultados e discussão.....	60
4.3.1. Caracterização da amostra.....	60
4.3.2. Extracção de pesticidas em mel adquirido no mercado da região de Lisboa.....	61
4.3.3. Resultados das análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa.....	63
4.3.3.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> .....	63
4.3.3.2. Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores.....	63
4.3.3.3. Contagem de bolores e leveduras.....	63
<b>Capítulo V: Conclusões.....</b>	<b>64</b>
5.1. Desenvolvimento do método de extracção de pesticidas no mel.....	64
5.2. Caracterização da oferta de mel e conformidade de rotulagem.....	64
5.3. Detecção de pesticidas no mel por cromatografia de camada fina usando o método de extracção desenvolvido.....	65
5.4. Análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa.....	65
<b>Bibliografia.....</b>	<b>67</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>79</b>
1. Folha de recolha de dados relativa à informação ao consumidor e rastreabilidade.....	79
2. Folha de recolha de dados relativa à caracterização da oferta.....	80
3. Procedimento de Extracção para Lindano (OC), Cumafos (OF), Metiocarbe (C).....	81
4. Procedimento de Extracção para Amitraz (Formamidina).....	82
5. Reagentes e revelação utilizados.....	83

## Índice de Figuras

Figura 1 – Homem colhendo mel .....	2
Figura 2 – Anatomia da Abelha.....	3
Figura 3 – Importação Mundial de mel 2003-2007 .....	14
Figura 4 – Exportação Mundial de mel 2003-2007 .....	14
Figura 5 – Produção de mel na Europa e UE.....	15
Figura 6 – Maiores Produtores da UE-27.....	17
Figura 7 – Importação de mel na Europa e UE-27 .....	17
Figura 8 – Exportação de mel na Europa e UE-27.....	18
Figura 9 – Mapa das Zonas Controladas .....	20
Figura 10 – Mapa dos Méis com Denominação de Origem Protegida.....	21
Figura 11 – Produção de mel em Portugal 2001-2008 .....	22
Figura 12 – Fórmula do Lindano .....	30
Figura 13 – Fórmula do Cumafos.....	31
Figura 14 – Fórmula do Metiocarbe sulfóxido .....	32
Figura 15 – Fórmula do Amitraz.....	33
Figura 16 – Preparação das placas de cromatografia .....	45
Figura 17 – Tina de cromatografia .....	46
Figura 18 – Esquema de placa de cromatografia, cálculo do Rf .....	50

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição do mel de néctar.....	6
Tabela 2 – Critérios de composição dos méis.....	7
Tabela 3 – Produção Mundial de mel por Continente 2003-2007.....	12
Tabela 4 – Produção de mel por País, 2003-2007.....	13
Tabela 5 – Consumo Mundial de mel.....	15
Tabela 6 – Produção Europeia de mel 2003-2007.....	16
Tabela 7 – Consumo de mel na Europa.....	18
Tabela 8 – Dados estatísticos sobre a produção e consumo de mel em Portugal.....	22
Tabela 9 – Estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) dos valores obtidos para os factores de retenção (Rf) dos diferentes padrões de pesticidas (Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz) no mesmo dia e em diferentes dias ...	51
Tabela 10 – Quantidade mínima detectada (Limite de detecção – LD) de cada pesticida padrão .....	52
Tabela 11 – Resultados da extracção de pesticidas em amostras fortificadas em Cromatografia de Camada Fina.....	53
Tabela 12 – Avaliação da rotulagem da oferta de méis em 10 estabelecimentos de Lisboa	55
Tabela 13 – Avaliação da rotulagem da amostra de 23 méis analisados .....	60
Tabela 14 – Resultados obtidos na pesquisa de cumafos, lindano, metiocarbe sulfóxido e amitraz por cromatografia de camada fina em mel adquirido na região de Lisboa.....	61
Tabela 15 – Resultados obtidos na pesquisa de cumafos, lindano, metiocarbe sulfóxido e amitraz por cromatografia de camada fina em mel adquirido na região de Lisboa.....	62

## Lista de Abreviaturas

aw – actividade da água

C – Carbamatos

CAS – *Chemical Abstract Service*

CCF – Cromatografia de Camada Fina

CE – Comunidade Europeia

DGV – Direcção Geral de Veterinária

DL – Decreto-Lei

ECD – Detector de captura electrónica (Ing. *Electron Capture Detector*)

EFSA - *European Food Safety Authority*

EMA – *European Medicines Agency*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

GC – Cromatografia Gasosa (Ing. *Gas Chromatography*)

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

LD – Limite de detecção

LMR – Limite Máximo de Resíduos

NPD - *Nitrogen Phosphorus detection*

NP – Norma Portuguesa

OC – Organoclorados

OF – Organofosforados

PAN – Programa Apícola Nacional

PSA – Programa Sanitário Apícola

Rf – Factor de retenção (Ing. *Retention Factor*)

TLC – *Thin-Layer Chromatography*

UE – União Europeia

ufc – Unidades Formadoras de Colónias

UV – Radiação ultravioleta

v/v – volume/volume

WHO – *World Health Organization*

µl – microlitro

µg – micrograma

# Capítulo I: Introdução

## 1.1. Objectivos

O mel é um alimento importante na nutrição humana, muito utilizado em Portugal como adoçante e como ingrediente na doçaria. Este é um alimento rico em hidratos de carbono ao qual são reconhecidas propriedades benéficas.

O mel é utilizado na alimentação de crianças, adultos e idosos sendo muito importante a sua qualidade química e microbiológica. É um alimento natural produzido pelas abelhas, *Apis mellifera*, pelo que está sujeito a contaminantes de vária natureza, nomeadamente os poluentes ambientais, os pesticidas agrícolas, produtos utilizados na apicultura e ainda microrganismos patogénicos que nele podem ser incorporados durante o processamento.

O presente trabalho, desenvolvido no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, teve como objectivo geral a avaliação da qualidade do mel, do ponto de vista da segurança alimentar. Uma vez que este alimento se apresenta como uma matriz de difícil manipulação para a determinação dos contaminantes químicos através da Cromatografia de Camada Fina (CCF), foi necessário, numa primeira fase, o desenvolvimento de técnicas laboratoriais de extracção de pesticidas. Seguiu-se depois uma segunda fase de avaliação da oferta de mel ao consumidor de Lisboa e a avaliação da sua qualidade em termos de contaminantes químicos e microbiológicos, numa amostragem de vários méis de néctar adquiridos nos mercados de Lisboa.

Assim constituíram objectivos específicos deste trabalho:

- Desenvolver um método de extracção de pesticidas no mel que fosse simples e possível de utilizar como método de rastreio recorrendo à CCF para a sua detecção;
- Caracterizar a oferta de mel que está à disposição do consumidor no mercado da região de Lisboa;
- Analisar a rotulagem das embalagens de mel, com a finalidade de observar se a informação fornecida ao consumidor cumpre os requisitos legais;
- Pesquisar contaminantes químicos (lindano, cumafos metiocarbe sulfóxido e amitraz), numa amostra de méis, por Cromatografia de Camada Fina (CCF), utilizando o método de extracção desenvolvido;

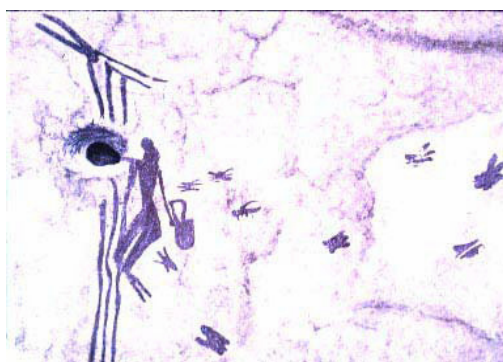
- Pesquisar contaminantes microbiológicos (presença de *Salmonella* e de esporos de clostrídeos sulfito-redutores e a contagem de bolores e leveduras) em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa.

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Clínica e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Técnica de Lisboa.

## 1.2. História do mel através dos tempos

O homem primitivo, para conseguir mel, tirava os ninhos de abelhas das árvores ocas ou cavidades das rochas. A recolha deste alimento disponível na natureza, muito nutritivo e de sabor agradável, nem sempre se afigurava fácil, principalmente quando os enxames selvagens ocupavam ninhos em locais pouco acessíveis para o homem (Soeiro, 2006). Esta actividade ancestral e predatória, que frequentemente destruía os enxames, encontra-se documentada numa imagem (Figura 1) pintada, datada do Neolítico, em Cuevas de la Araña, Valência, Espanha (Bogdanov, 2009).

**Figura 1 – Homem colhendo mel**



Fonte: Bogdanov, 2009

Conhecido desde a antiguidade, o mel foi durante muito tempo o único adoçante usado pelo homem, até ser gradualmente substituído por outros açúcares, como os de cana-de-açúcar e da beterraba.

Existem referências às abelhas e ao mel nas antigas civilizações da Mesopotâmia, Babilónia, Pérsia, Suméria e Anatólia em que predominava a actividade recolectora.

À medida em que o homem se foi tornando sedentário, surgiu a necessidade de situar as abelhas próximo dos povoados. Em 5000 AC, os egípcios já possuíam colmeias de argila o

que permitia a fixação próxima das residências; eles foram os primeiros apicultores. Usaram o fumo para pacificar e afastar as abelhas durante a colecta e usaram o mel como medicamento e em rituais religiosos (Crane, 1999; Paula, 2008).

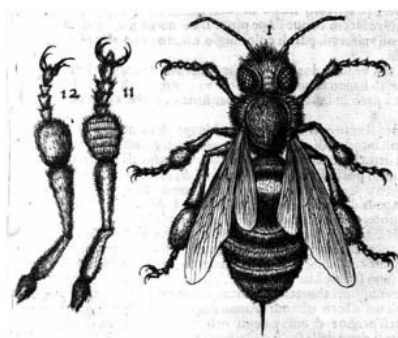
Gregos e Romanos vão conceder ao mel um lugar importante. Os Gregos usaram como colmeias recipientes de palha trançada, em forma de sino, designadas colmos. O mel era a principal fonte de açúcar mas servia também de alimento às crianças, atletas, guerreiros e entrava na composição de bebidas. A importância do mel para os Gregos foi documentada e referida pelos seus mais importantes filósofos (Homero, Platão, Aristóteles, Demócrito, Hipócrates) os quais chamaram a atenção para o valor nutricional e medicinal do mel (Crane, 1999; CATIM, 2009).

Na Bíblia existem numerosas referências e salmos mencionando o mel e as suas propriedades (Crane, 1999). No Exodus 3:8 a Terra Prometida aos judeus é descrita como um paraíso de onde jorrava leite e mel.

Na Idade Média e em certos territórios Europeus as árvores que abrigavam abelhas passaram a ser propriedade dos estados sendo proibido o seu abate (Crane, 1999; Paula, 2008). Os enxames tinham grande importância económica, sendo considerado crime grave o roubo de enxames ou de mel, com punição que podia ir até à morte dos infractores. Nessa época, a Igreja precisava de cera para as velas e mel para os manjares, promovendo o trabalho ligado ao mel e impulsionando de certo modo a apicultura. Era nos mosteiros que tais actividades eram desenvolvidas, com colecta de mel, produção de licores e doçarias (CATIM, 2009).

A partir do século XVI sucedem-se acontecimentos importantes relacionados com as abelhas, pois os avanços científicos e técnicos possibilitaram a compreensão de aspectos fundamentais do ciclo de vida e biologia das abelhas. Em 1586, a abelha rainha é descrita como fêmea, sendo em 1609 o zangão referido como macho e as obreiras como fêmeas que possuíam um lugar definido para criar a descendência (Noticias Apícolas, 2009). Em 1630 Stelluti desenhou com grande minúcia a abelha (Figura 2) com o auxílio do microscópio (Stelluti, 1630 – citado por FAO, 2008).

**Figura 2 – Anatomia da Abelha**



Fonte: Stelluti, 1630 – citado por FAO, 2008

A identificação da rainha como fêmea e o zangão como macho e o facto de as abelhas poderem criar uma rainha a partir de ovos ou larvas, são também publicados na Alemanha (1568, 1771). Sucedeu-se a descrição correcta da produção de cera de abelha (1744) e o papel das abelhas na fertilização das flores (1793). No entanto, até aos finais do séc. XIX, a questão de como tirar o mel da colmeia sem matar as abelhas continuava sem resposta (Notícias Apícolas, 2009).

Em 1851, Lorenzo Lorraine Langstroth observou que as abelhas numa colmeia preenchiavam com própolis qualquer espaço inferior a 4,7 mm e construía favos em qualquer espaço superior a 9,5 mm. A média entre os dois valores, 7,9 mm, Langstroth chamou “espaço abelha”, sendo o menor espaço livre existente no interior de uma colmeia, por onde passam duas abelhas ao mesmo tempo. Este espaço não é colmatado nem com própolis nem com construção de favos e deverá permanecer livre para a execução das diferentes tarefas que as abelhas executam na colmeia, trânsito, alimentação, ventilação. Assim, restava construir uma colmeia respeitando as regras de arquitectura que as abelhas cumprem na natureza. Tendo por base o modelo de colmeia de Francis Huber, Langstroth criou a colmeia de quadros móveis. Nesta colmeia, os quadros podem ser retirados pelo topo ou movidos lateralmente dentro da caixa. Assim nasceu a colmeia Langstroth usada até aos nossos dias (CATIM, 2009).

Há muitas espécies de abelhas. As abelhas do mel, espécie *Apis*, são insectos sociais, vivendo em colónias, que cooperam para cuidar das gerações mais novas (ovo, larva, pupa) e da rainha (única fêmea produtora de ovos), tarefa a cargo da casta das abelhas obreiras (fêmeas não produtoras). Os machos (zangões) fertilizam a rainha, aquando do seu voo nupcial, único momento em que isso acontece (Wiley Encyclopedia, 1999).

Há também muitas espécies, subespécies, raças e sub-raças de abelhas do mel que estão adaptadas ao seu ambiente. As espécies mais importantes para a apicultura são a abelha ocidental, *Apis mellifera*, nativa da Europa e hoje espalhada por todos os continentes, e a abelha oriental, *Apis cerana*, muito importante no continente Asiático. Em relação à capacidade de produção de mel a *A. mellifera* é maior produtora que a *A. cerana* (OIE, 2010). Outros produtos da colmeia, para além do mel, são a cera, o pólen, o própolis, a geleia real, a apitoxina, a polinização e a criação de rainhas e enxames.

A abelha do mel Europeia, espécie *Apis mellifera*, inclui várias sub-espécies. As originárias da Europa, entre outras, são *Apis mellifera mellifera* originária do Norte da Europa, *Apis mellifera linguistica* originária da Itália, *Apis mellifera caucasica* originária do Sul da Rússia, *Apis mellifera carnica* originária da Áustria e Vale do Danúbio, *Apis mellifera scutellata* originária do Leste de África (Uniprot Taxonomy, 2009).

### **1.3. Caracterização do mel**

#### **1.3.1. Definição**

Mel é definido como 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 ainda de excreções de insectos sugadores de plantas (*Hemiptera*) que ficam sobre partes vivas das plantas e que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos da colmeia (Decreto-Lei nº 214/2003, Codex Stan 12 – 1981).

De acordo com a sua origem, são considerados dois tipos de mel: o mel de néctar, obtido do néctar, das plantas e o mel de melada, obtido das excreções dos insectos sugadores de plantas ou das secreções provenientes de plantas.

O estudo desenvolvido neste trabalho incidiu sobre o mel de néctar.

Após a colheita do néctar, a primeira fase de transformação do néctar em mel, vai ocorrer no pré-estômago das abelhas através da adição de enzimas (invertase ou sacarase) que desdobram a sacarose em frutose e glicose. A fase seguinte, designada trofilaxia, consiste em passagens sucessivas do mel de umas abelhas para outras, sofrendo transformações por acção enzimática e concentração em açúcares simples. O passo seguinte consiste na deposição do mel nos alvéolos da colmeia, quando o conteúdo em humidade está entre os 30 e 40%. A eliminação do excesso de humidade continua até à selagem dos favos (operculação), altura em que a humidade do mel rondará os 20% (PAN 2008-2010, Bogdanov, 2009).

A colheita do mel é realizada quando a maior parte dos favos estão selados. As alças são transportadas para a melaria, onde se procede à desoperculação, centrifugação e filtração (tamanho do poro não superior a 0,2 mm) para o tanque. No tanque fica em repouso à temperatura de  $\pm 30^{\circ}\text{C}$  de modo a reduzir a viscosidade do mel e permitir a decantação, sendo possível retirar as partículas de cera. É então acondicionado em contentores ou embalagens para o consumidor final (Bogdanov, 2009).

#### **1.3.2. Composição do mel**

A composição química do mel (Tabela 1) depende da sua origem floral (EC, 2002), mas é também afectada pelo clima, condições ambientais e práticas apícolas. A diversidade das propriedades físico-químicas do mel depende do néctar e pólen da planta do qual é originário fazendo variar a cor, o aroma e o sabor (Azeredo, Azeredo, Sousa, Dutra, 2003; Özcan, Arslan, Ceylan, 2006).

**Tabela 1 – Composição do mel de néctar**

	<b>Mel de néctar</b>	<b>Mínimo – máximo</b>
<b>Teor de água</b>	17,2	15-20
<b>Frutose</b>	38,2	30-45
<b>Glucose</b>	31,3	24-40
<b>Sacarose</b>	0,7	0,1-4,8
<b>Outros dissacarídeos</b>	5,0	28
<b>Melezitose</b>	<0,1	
<b>Erllose</b>	0,8	0,56
<b>Outros oligossacarídeos</b>	3,6	
<b>Total de açúcares</b>	79,7	
<b>Minerais</b>	0,2	0,1-0,5
<b>Aminoácidos, proteínas</b>	0,3	0,2-0,4
<b>Ácidos</b>	0,5	0,2-0,8
<b>pH</b>	3,9	3,5-4,5

Fonte: Bogdanov, 2009, (g/100 g)

De um modo geral, o mel é constituído por diversos açúcares, predominando a frutose e a glucose, assim como por outras substâncias tais como ácidos orgânicos, enzimas e partículas sólidas provenientes da sua colheita (Decreto-Lei nº 214/2003).

Os carboidratos são os componentes maioritários. Predominam os monossacarídeos, frutose e glucose com 38 g/100g e 31 g/100g, respectivamente. Os méis poliflorais apresentam conteúdos de frutose e glucose em proporções quase iguais, enquanto que nos méis monoflorais o conteúdo de frutose é significativamente maior. O valor de 65 g/100g para os dois monossacarídeos (frutose + glucose) abrange se não todos, pelo menos a maioria dos méis originários de néctar. Frutose e glucose podem já estar presentes no mel, em maior ou menor grau, dependendo da origem floral, ou serem provenientes da hidrólise do dissacarídeo sacarose (que predomina no néctar), também presente no mel, catalisada pela enzima invertase. Muitos outros açúcares foram isolados em mel, como por exemplo os dissacarídeos, sacarose, maltose, turanose e o trissacarídeo erlose, que são os que se apresentam em maior quantidade (Moreira & De Maria, 2001).

O perfil dos açúcares do mel (teor de frutose, teor de glucose, razão frutose-glucose, razão glucose-água) pode ser um parâmetro complementar à análise microscópica do mel, no que diz respeito à identificação do tipo floral nos méis monoflorais (Moreira & De Maria, 2001; Bogdanov, Ruoff, Oddo, 2004; Bogdanov, 2009).

O critério de composição, teor de açúcares, definido no Decreto-Lei nº 214/2003 é de 60 g/100g para a frutose e glucose (total dos dois) e de 5 g/100g para a sacarose (Tabela 2).

**Tabela 2 – Critérios de composição dos méis**

Parâmetro	Especificação	
	Mel de néctar	Mel de melada
<b>Açúcares (frutose+glucose)</b>	Mínimo 60 g/100 g	Mínimo 45 g/100 g
<b>Sacarose</b>	Máximo 5 g/100 g	
<b>Água</b>	Máximo 20%	
<b>Matérias insolúveis na água</b>	0,1 g/100 g	
<b>Condutividade eléctrica</b>	Máximo 0,8 mS/cm	Mínimo 0,8 mS/cm
<b>Ácidos livres</b>	Máximo 50 mEq/1000 g	
<b>Índice diastásico (escala de Schade)</b>	Mínimo 8 ou 3 se HMF ≤ 15 mg/kg	
<b>Hidroximetilfurfural (HMF)</b>	Máximo 40 mg/kg	

Fonte: Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro

A glucose é também importante no que diz respeito à cristalização. Durante o processo de cristalização a maior parte da glucose cristaliza formando glucose monohidratada e a frutose que é mais solúvel permanece em solução por longo tempo. A água que estava ligada à glucose fica livre, o que significa que a actividade da água aumenta na fase líquida (Gleiter, Horn, Isengard, 2006). Vários parâmetros têm sido propostos para prever a velocidade de cristalização do mel e de um modo geral é reconhecido que o mel cristaliza mais depressa quando o teor em glucose se situa entre 280-300 g/kg; a razão glucose-água (G/A) é maior que 2,1; a razão frutose-glucose (F/G) é menor que 1,14 e a razão (glucose-água) -frutose (G-A /F) é elevada (Tosi, Ré, Lucero, Bulacio, 2004).

O teor em água é um parâmetro de qualidade importante pois permite prever a duração do produto, capacidade de o mel se manter estável e livre de fermentação (Bogdanov *et al.* 2004), sabendo-se que, quanto maior o teor em água maior é a probabilidade de o mel fermentar durante o seu armazenamento. Como produto higroscópico o mel pode absorver e reter humidade, durante a extracção em dias húmidos, o armazenamento inadequado e em embalagens mal fechadas (Vargas, 2006). O critério de composição admite um máximo de 20% conforme mostra a Tabela 2.

O teor de matérias insolúveis em água está em geral relacionado com o teor de sujidade do mel (cera, grãos de pólen, outros componentes normais do sedimento do mel), que são separados por decantação. Este parâmetro fornece indicação sobre a higiene do

processamento do mel (Vargas, 2006). O critério de composição admite um máximo de 0,1 g/100g (Tabela 2).

A condutividade eléctrica depende do conteúdo em cinzas e ácido do mel. É um bom critério para avaliar a origem botânica de méis monoflorais. O critério de composição (Tabela 2) é de 0,8 mS/cm (milli Siemens/cm), com excepção para méis de medronheiro, erica, eucalipto, tília, torga ordinária, leptospermo e melaleuca, nos quais a condutividade eléctrica apresenta uma variação considerável (Bogdanov, Martin, Lüllmann, 1997; Bogdanov *et al.*, 2004).

Todos os méis têm uma reacção ácida e valores de pH compreendidos entre 3,5 e 4,5, devido à presença de ácidos orgânicos, o que contribui para formar o sabor do mel para além de conferir estabilidade contra degradação microbiana (Bogdanov *et al.*, 2004).

Os ácidos orgânicos também se encontram combinados sob a forma de lactonas; quando o mel se alcaliniza, as lactonas originam os ácidos correspondentes, produzindo acidificação e constituem uma reserva potencial de acidez, acidez lactónica, que juntamente com a acidez livre constitui a acidez total (Valbuena, 1992).

Vários ácidos têm sido encontrados no mel nomeadamente os ácidos fórmico, acético, cítrico, láctico, málico, oxálico, piroglutâmico, succínico e o ácido glicónico, em maior quantidade. O ácido glicónico resulta da oxidação da glucose por acção da enzima glucose oxidase. Esta reacção produz o ácido glicónico, a lactona (gluconolactona, que posteriormente se pode transformar em ácido glicónico) e o peróxido de hidrogénio, implicado na propriedade antimicrobiana do mel (Bogdanov *et al.*, 2004).

O critério de composição em relação à acidez diz respeito ao conteúdo em ácidos livres (Tabela 2) e é de 50 miliequivalentes por kg.

A maior parte das proteínas do mel são enzimas. O mel contém diferentes aminoácidos sendo a sua maioria prolina, adicionado ao mel pelas abelhas (Bogdanov *et al.*, 2004). A quantidade de proteínas no mel é baixa, cerca de 0,3 g/100 g (0,2-0,4) (Tabela 1).

Os méis contêm enzimas produzidas pelas abelhas (sucos salivares e secreções faríngeas) que são usadas como indicadores de qualidade, juntamente com outros parâmetros. As enzimas presentes em maior quantidade no mel são a invertase, amilase (diastase) e a glucose oxidase; a catalase e a fosfatase ácida estão também presentes. A amilase é produzida pelas glândulas das abelhas e está envolvida na degradação do amido em açúcares mais simples. A amilase, com raras excepções, não existe no néctar. A actividade diastásica é um índice de frescura do mel, mas a interpretação deve ser feita tendo em consideração o teor em hidroximetilfurfural (HMF). Existem méis com valores baixos, como por exemplo o mel de eucalipto (Valbuena, 1992). O índice diastásico diminui com o tempo

de armazenamento. A diastase é mais sensível ao calor que a invertase sendo por isso usada para avaliar sobreaquecimento ou adulteração (Vargas, 2006).

O critério de composição para o Índice diastásico (Tabela 2) é de no mínimo 8 ou 3 para teor de hidroximetilfurfural não superior a 15 mg/kg.

A invertase ou sacarase é produzida nas glândulas hipofaríngeas das abelhas. Hidrolisa a sacarose do néctar em glucose e frutose produzindo a alteração química mais importante que transforma o néctar em mel (Valbuena, 1992).

A glucose oxidase, como já referimos, é responsável pela hidrólise da glucose com produção de peróxido de hidrogénio, ácido glicónico e sua lactona (Valbuena, 1992).

O hidroximetilfurfural (HMF) é um composto formado por degradação de produtos açucarados e está directamente relacionado com alterações da cor, desenvolvimentos de sabores e odores estranhos, sendo um parâmetro de avaliação da qualidade (Valbuena, 1992). Forma-se por desidratação de hexoses em condições ácidas, numa velocidade que varia directamente com a temperatura. A conservação ao abrigo da luz diminui a formação de HMF. O mel possui naturalmente HMF, mas um nível elevado é indicativo de armazenamento prolongado, sobreaquecimento ou adulteração (Vargas, 2006).

O critério de composição admite hidroximetilfurfural (HMF) (Tabela 2) no máximo de 40 mg/kg.

O conteúdo em minerais é relativamente baixo e sua quantidade no mel é de cerca de 0,2 g/100g (Tabela 1).

Predomina o potássio (51 mg/100 g), estando também presente o sódio (12 mg/100 g), fósforo (10 mg/100 g), magnésio (2,0 mg/100 g), ferro (0,4 mg/100 g) e zinco (0,9 mg/100 g) (INSA, 2006). Composições do solo (origem geográfica), clima e origem botânica são factores que influenciam o conteúdo do mel em minerais (Valbuena, 1992; Pohl, 2009).

O conteúdo do mel em vitaminas é, de um modo geral, baixo e varia com a origem floral (Valbuena, 1992). Algumas das vitaminas presentes no mel são a tiamina (B<sub>1</sub>) (0,010 mg%), a riboflavina (B<sub>2</sub>) (0,040 mg%), a niacina (B<sub>3</sub> ou PP) (0,30 mg%), a piridoxina (B<sub>6</sub>) (0,20 mg%) (INSA, 2006). O ácido ascórbico (antioxidante fisiológico para a protecção contra doenças degenerativas e processos degenerativos causados pelo stress oxidativo) é a única vitamina presente em quantidades apreciáveis no néctar e no mel, com um teor de 0,5 mg/100 g, pode apresentar valores mais elevados, variáveis com a origem floral. São referidos valores como 37 mg/100 g ou mesmo 67 mg/100 g no mel de acácia e 263 mg/100 g no mel de floresta (Vargas, 2006; Kesié *et al.*, 2009).

A cor do mel é muito variável, de branco água a âmbar escuro. Depende da origem botânica, da idade e das condições de armazenamento. A cor é expressa em mm pela escala de Pfund e compreende branco-água, extra-branco, branco, âmbar extra-claro, âmbar claro, âmbar, âmbar escuro (Vargas, 2006).

### **1.3.3. Propriedades do mel – actividade antioxidante e actividade antimicrobiana**

O mel apresenta reconhecidas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. A actividade antioxidante, está relacionada com a acção de flavonóides, compostos fenólicos existentes no mel, os quais podem inibir radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular (Socha, Juszczak, Pietrzyk, Fortuna, 2009), de ácido ascórbico e de enzimas como a glucose oxidase, a catalase e a peroxidase (Kujawski & Namiésnik, 2008).

A actividade antimicrobiana relaciona-se com a elevada pressão osmótica e baixa actividade da água (aw) com valores de 0,5 a 0,6, deixando poucas moléculas de água livres para suportar o crescimento bacteriano; com a produção de peróxido de hidrogénio (pela acção da glucose oxidase sobre a glucose); com a elevada acidez (inibindo o crescimento da maior parte dos microrganismos), com a viscosidade, que decresce rapidamente com o aumento de temperatura e com a presença de fitoquímicos (Kujawski & Namiésnik, 2008).

### **1.3.4. Mel como alimento e outros usos**

O consumo de mel directamente na alimentação humana é o principal uso deste produto, ainda que seja usado também como ingrediente em várias preparações culinárias, em produtos de pastelaria, na preparação de bebidas não alcoólicas e também na cosmética (Olaitan, Adeleke, Ola, 2007). É um alimento muito energético, representado por uma solução concentrada de frutose-glucose; 100 g de mel fornecem 309 kcal (INSA, 2006).

Outros usos estão relacionados com o tratamento de feridas crónicas, inflamações orofaríngeas, gastrites, a utilização como calmante, etc.

O mel foi usado pelas civilizações antigas como medicamento e sempre foi usado por todos os povos em “medicações caseiras”, papel que só entrou em declínio com a chegada da era dos antibióticos. O aumento do número de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos fez com que fosse redescoberto pelos profissionais da medicina. As suas propriedades permitem o seu uso no tratamento de feridas e úlceras (Molan, 2001; Molan, 2006), tratamento de algumas doenças respiratórias, gástricas e é um estimulante do sistema imunitário (Kujawski & Namiésnik, 2008). Um dos méis mais estudados, usado e

comercializado para uso em tratamentos médicos (esterilizado por radiação gama) é o mel proveniente de *Leptospermium scoparium*, espécie vegetal proveniente da Nova Zelândia e de uma espécie similar proveniente da Austrália (Molan, 2006).

Alguns cuidados a ter com o consumo de mel estão relacionados com a contra indicação de consumo em crianças de idade inferior a 12 meses, devido à possibilidade de ingestão de esporos botulínicos juntamente com o mel, podendo estes germinar, colonizar o intestino e libertar a toxina, que é então absorvida; esta situação é devida à imaturidade do sistema imunitário (EC, 2002).

A ocorrência de botulismo por contaminação de feridas, devido ao uso do mel no seu tratamento, embora sendo possível, nunca foi reportada, mas ainda assim, o mel usado em tratamentos médicos (Nova Zelândia e Austrália) é esterilizado por radiações ionizantes (Molan, 2006).

O índice glicémico (IG) e a carga glicémica (CG) são parâmetros usados na tentativa de entender como é que os carboidratos de um determinado alimento afectam a glicémia. Em relação aos méis, este é um aspecto controverso e em estudo. Alguns estudos desenvolvidos, mostram uma correlação negativa entre o conteúdo em frutose e o índice glicémico, provavelmente devido à razão frutose-glucose, não se observou uma correlação significativa entre os outros açúcares do mel. Para atender à quantidade de alimento ingerida foi criado um novo termo, a carga glicémica (CG). Alimentos com CG menor que 10, são considerados como tendo CG baixa, de 10 a 20, intermédios, acima de 20, altos. Ingerindo uma porção de 25 g de mel, a carga glicémica da maior parte dos méis é baixa (menor que 10) e outros méis posicionam-se na CG intermédia (CG 10 a 20). Em pacientes diabéticos o mel, em comparação com a glicose, provocou uma descida da glicémia. De qualquer modo, o conceito de índice glicémico para a população em geral é ainda um assunto em discussão (Bogdanov, Jurndic, Sieber, Gallmann, 2008).

A incidência de alergia ao mel, apurada num estudo envolvendo pacientes com historial de alergia alimentar, foi de 2,3%, tendo a alergia sido explicada pela presença de componentes com origem nas abelhas. Outros estudos indicam reacções desde tosse a anafilaxia, enquanto outros indicam ainda que pacientes alérgicos ao pólen raramente são alérgicos ao mel, ainda que haja, no entanto, casos reportados (Bogdanov *et al.*, 2008).

Casos de intoxicação por méis provenientes de plantas da família das *Ericaceae*, como *Rhododendron*, também são referidos na literatura e estão relacionados com a presença de grayanotoxano e alcalóides pirrolizidínicos. Os sintomas dependem da dose ingerida e vão desde sintomas ligeiros, como hipersalivação, náusea, vómitos, até sintomas mais graves como bloqueio atrioventricular completo (Koca, Koca, 2007; Bogdanov, 2009). A proibição de produção de mel onde essas plantas crescem é um modo de contornar o problema e os consumidores são aconselhados a adquirir mel do mercado e não directamente ao apicultor.

As regiões onde têm sido reportados casos são o Cáucaso, Turquia, Nova Zelândia, Austrália, Japão, Nepal, África do Sul e diferentes países da América do Norte e Sul (Bogdanov, 2009).

#### 1.4. Produção de mel

Todos os dados referidos (dados oficiais, não oficiais e estimados) neste ponto têm como fonte FAOSTAT 2009, excepto quando indicação em contrário.

##### 1.4.1. Produção no Mundo e na UE

A quantidade Mundial de mel produzida em 2007 foi de 1.400.491 toneladas (Tabela 3) e o Continente com maior produção foi a Ásia (com 39% da produção), seguido pela Europa, América, África e Oceânia, com 24%, 23%, 12% e 2% respectivamente (FAOSTAT, 2009).

**Tabela 3 – Produção Mundial de mel por Continente 2003-2007**

Continente	2003	2004	2005	2006	2007	%
Ásia	513.331	519.395	540.801	559.039	547.845	39%
Europa	317.192	336.878	342.584	352.668	338.989	24%
América	321.689	331.314	347.496	338.316	317.292	23%
África	152.866	156.311	155.687	167.275	167.868	12%
Oceânia	29.050	25.738	26.507	28.745	28.497	2%
Total	<b>1.334.128</b>	<b>1.369.636</b>	<b>1.413.075</b>	<b>1.446.043</b>	<b>1.400.491</b>	<b>100%</b>

Fonte: FAOSTAT, 2009, toneladas.

De acordo com a Tabela 3, a produção mundial apresenta um ligeiro crescimento, mais expressivo na Ásia e na Europa, entre 2003 e 2007. No entanto o total da produção Mundial em 2007 esteve ligeiramente abaixo da produção de 2006.

A Tabela 4 apresenta a produção de mel por país.

**Tabela 4 – Produção de mel por País, 2003-2007**

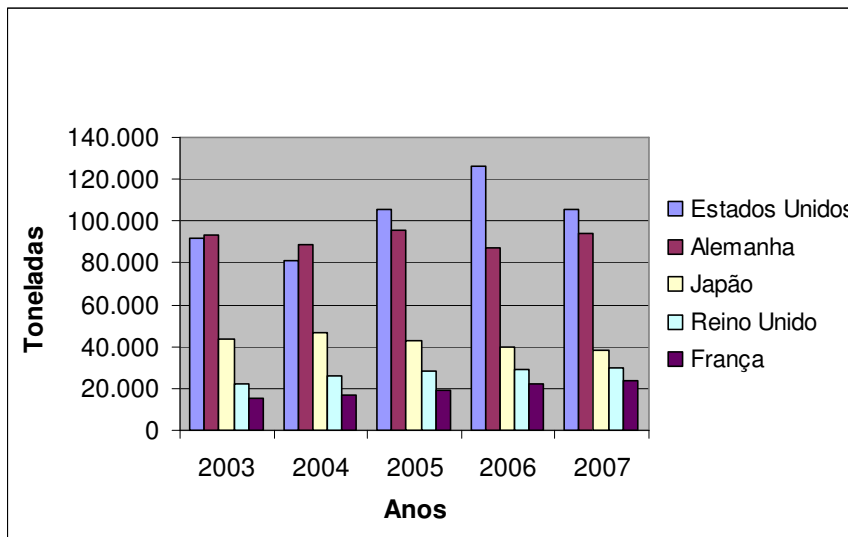
<b>Países</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>%</b>
<b>China</b>	294.721	297.987	299.327	304.978	303.220	22%
<b>Argentina</b>	75.000	80.000	110.000	80.000	81.000	6%
<b>Turquia</b>	69.540	73.929	82.336	83.842	73.935	5%
<b>Ucrânia</b>	53.550	57.878	71.462	75.600	67.700	5%
<b>Estados Unidos A</b>	82.431	83.272	72.927	70.238	67.286	5%
<b>México</b>	57.045	56.917	50.631	55.970	55.459	4%
<b>Federação Russa</b>	48.048	52.666	52.123	55.316	55.173	4%
<b>Índia</b>	52.000	52.000	52.000	52.000	52.000	4%
<b>Etiópia</b>	37.800	40.900	36.000	44.000	44.000	3%
<b>Irão</b>	28.000	28.000	28.000	36.000	36.000	3%
<b>Brasil</b>	30.022	32.290	33.750	36.194	34.747	2%
<b>Canadá</b>	34.602	34.241	36.109	48.353	31.489	2%
<b>Espanha</b>	35.279	36.695	27.230	30.661	31.250	2%
<b>Tanzânia</b>	27.000	27.000	27.000	27.000	27.000	2%
<b>Quênia</b>	22.000	21.500	22.000	25.000	25.000	2%
<b>Angola</b>	23.000	23.000	24.000	23.000	23.000	2%
<b>Coreia, Rep</b>	18.000	15.651	23.820	23.000	22.000	2%
<b>Austrália</b>	16.000	16.000	16.000	17.500	18.000	1%
<b>Grécia</b>	15.700	15.911	16.267	16.218	17.690	1%
<b>Roménia</b>	17.409	19.150	19.200	18.195	16.767	1%
<b>Outros</b>	296.981	304.649	312.893	322.978	317.775	23%
<b>Total</b>	<b>1.334.128</b>	<b>1.369.636</b>	<b>1.413.075</b>	<b>1.446.043</b>	<b>1.400.491</b>	<b>100%</b>

Fonte: FAOSTAT, 2009, toneladas

O país com maior produção de mel em 2007, a nível mundial, foi a China com 303 milhares de toneladas (22% da produção), seguido pela Argentina (6% da produção), Turquia, Ucrânia, Estados Unidos da América com 81, 74, 68 e 67 milhares de toneladas (5% da produção), respectivamente.

Em relação à importação, a nível mundial, os Estados Unidos da América lideram, seguidos da Alemanha, Japão, Reino Unido e França (Figura 3).

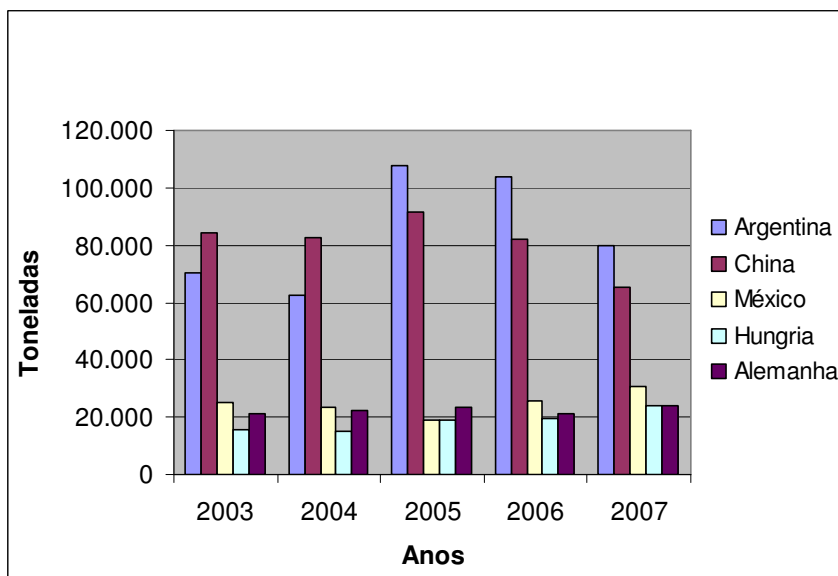
**Figura 3 – Importação Mundial de mel 2003-2007**



Fonte: FAOSTAT, 2009

Os maiores exportadores a nível mundial são liderados pela Argentina, seguida pela China e depois México, Hungria e Alemanha (Figura 4).

**Figura 4 – Exportação Mundial de mel 2003-2007**



Fonte: FAOSTAT, 2009

Os maiores consumidores de mel são a China, Estados Unidos, Alemanha, Turquia e a Ucrânia (Tabela 5).

O consumo *per capita* (kg/pessoa) de mel na Alemanha é de 1,5 kg, na Ucrânia 0,8 kg, na Turquia 0,7 kg, nos Estados Unidos da América 0,6 kg e na China 0,1kg (Bogdanov, 2009).

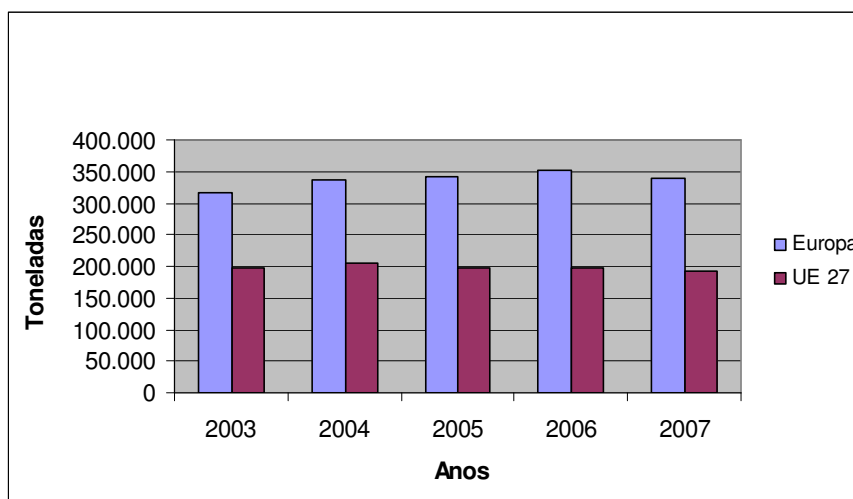
**Tabela 5 – Consumo Mundial de mel**

País	2003	2004	2005	2006	2007
<b>China</b>	210.393	215.495	208.042	222.977	237.932
<b>Estados Unidos A.</b>	169.550	160.231	174.559	196.309	172.724
<b>Alemanha</b>	96.062	92.159	93.367	84.541	86.306
<b>Turquia</b>	54.764	68.243	82.336	83.842	73.935
<b>Ucrânia</b>	53.550	53.236	67.648	69.039	67.700
<b>Federação Russa</b>	48.048	52.666	52.123	55.316	55.173
<b>Etiópia</b>	37.800	40.900	36.000	44.000	44.000
<b>Japão</b>	47.085	50.333	46.462	43.372	41.187
<b>Índia</b>	45.036	44.251	35.231	43.864	39.769
<b>Reino Unido</b>	28.867	30.893	32.980	36.180	37.309

Fonte: FAOSTAT 2009, toneladas

O **Continente Europeu** produziu em 2007 338.989 toneladas de mel (Tabela 6), das quais 193.075 toneladas (57%) foram produzidas pelos países da União Europeia (UE 27) (Figura 5).

**Figura 5 – Produção de mel na Europa e UE**



Fonte: FAOSTAT, 2009

A produção dos países europeus é apresentada na Tabela 6, encontrando-se Portugal sensivelmente a meio da tabela, que está ordenada pelo volume de produção.

**Tabela 6 – Produção Europeia de mel 2003-2007**

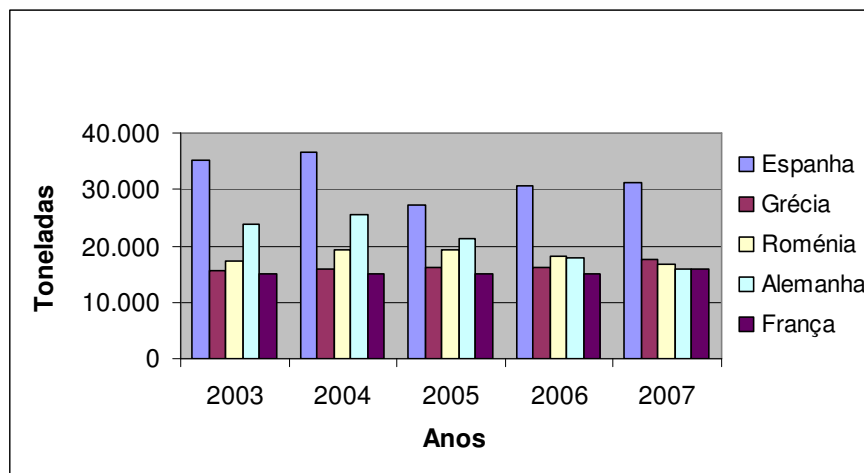
<b>Europa</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>%</b>
Ucrânia	53.550	57.878	71.462	75.600	67.700	20%
Federação Russa	48.048	52.666	52.123	55.316	55.173	16%
<b>Espanha</b>	35.279	36.695	27.230	30.661	31.250	9%
<b>Grécia</b>	15.700	15.911	16.267	16.218	17.690	5%
<b>Roménia</b>	17.409	19.150	19.200	18.195	16.767	5%
<b>Alemanha</b>	23.691	25.575	21.232	18.000	16.000	5%
<b>França</b>	15.000	15.000	15.000	15.000	16.000	5%
<b>Hungria</b>	21.000	19.504	19.714	17.319	15.933	5%
<b>Polónia</b>	11.620	11.957	9.955	13.546	14.954	4%
<b>Itália</b>	7.000	10.000	13.000	10.000	12.000	4%
<b>Checa, Rep</b>	6.303	7.738	8.371	9.081	8.467	2%
<b>Reino Unido</b>	7.000	5.000	5.000	7.000	7.200	2%
<b>Áustria</b>	7.100	6.400	6.100	6.000	6.500	2%
<b>Bulgária</b>	8.500	8.000	11.221	10.199	6.139	2%
<b>Portugal</b>	<b>7.310</b>	<b>6.737</b>	<b>5.686</b>	<b>6.000</b>	<b>6.100</b>	2%
<b>Eslováquia</b>	3.202	3.434	4.258	4.360	4.628	1%
Suíça	4.160	4.077	3.223	3.656	3.921	1%
Sérvia-Mont	3.627	3.972	4.275	4.048	3.538	1%
<b>Suécia</b>	3.400	3.400	3.400	3.500	3.400	1%
Bielorússia	1.856	2.438	2.980	3.179	3.216	1%
Bósnia Herg	1.150	2.296	2.635	3.017	2.773	1%
Croácia	1.616	2.543	2.657	2.246	2.638	1%
Moldávia	2.180	2.129	2.413	2.649	2.300	1%
<b>Bélgica</b>	1.600	2.156	2.150	2.150	2.150	1%
Albânia	1.235	1.990	1.816	2.114	2.071	1%
<b>Lituânia</b>	1.156	1.128	1.333	1.388	1.599	0%
<b>Eslovénia</b>	1.850	2.350	1.650	2.250	1.480	0%
<b>Dinamarca</b>	0	1.500	1.500	1.500	1.400	0%
<b>Finlândia</b>	1.700	1.400	2.300	3.041	1.400	0%
Noruega	1.500	1.300	1.500	1.300	1.400	0%
<b>Letónia</b>	552	746	916	1.383	900	0%
<b>Estónia</b>	535	555	638	1.033	756	0%
Macedónia	1.026	916	1.042	868	699	0%
Montenegro	0	0	0	522	485	0%
<b>Irlanda</b>	200	200	200	200	200	0%
<b>Luxemburgo</b>	137	137	137	129	162	0%
<b>Países Baixos</b>						0%
<b>Malta</b>						0%
<b>Chipre</b>						0%
<b>Total Europa</b>	<b>317.192</b>	<b>336.878</b>	<b>342.584</b>	<b>352.668</b>	<b>338.989</b>	<b>100%</b>

Fonte: FAOSTAT 2009, toneladas

O maior produtor de mel da Europa é a Ucrânia (20% da produção Europeia), seguido pela Rússia (16% da produção Europeia), Espanha, Grécia e Roménia (Tabela 6).

Dos **27 Países da União Europeia (UE-27)** o maior produtor é a Espanha (9% da produção Europeia e 2% da produção mundial), seguida da Grécia, Roménia, Alemanha e França com 5% da produção Europeia (Tabela 6; Figura 6).

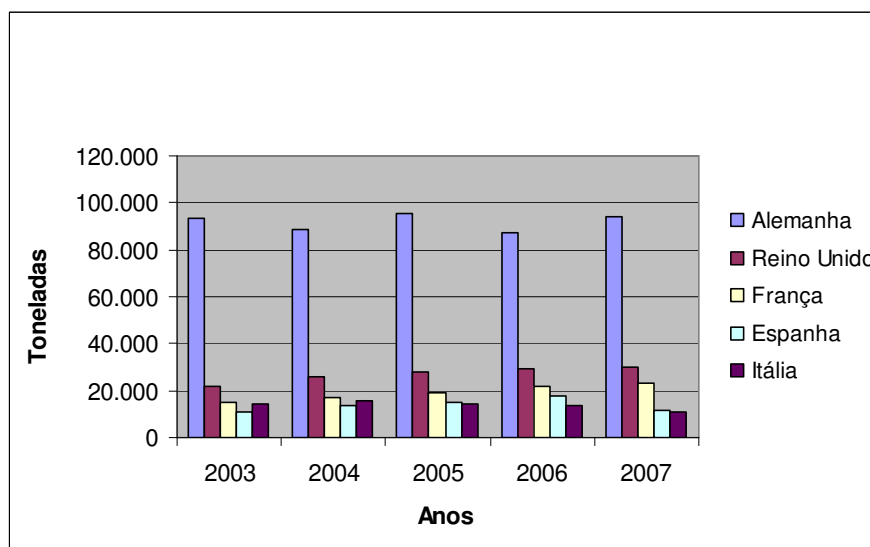
**Figura 6 – Maiores Produtores da UE-27**



Fonte: FAOSTAT, 2009

Em relação à importação, o país que importa maior quantidade de mel é a Alemanha (94.077 toneladas em 2007) seguida pelo Reino Unido, França, Espanha e Itália (Figura 7).

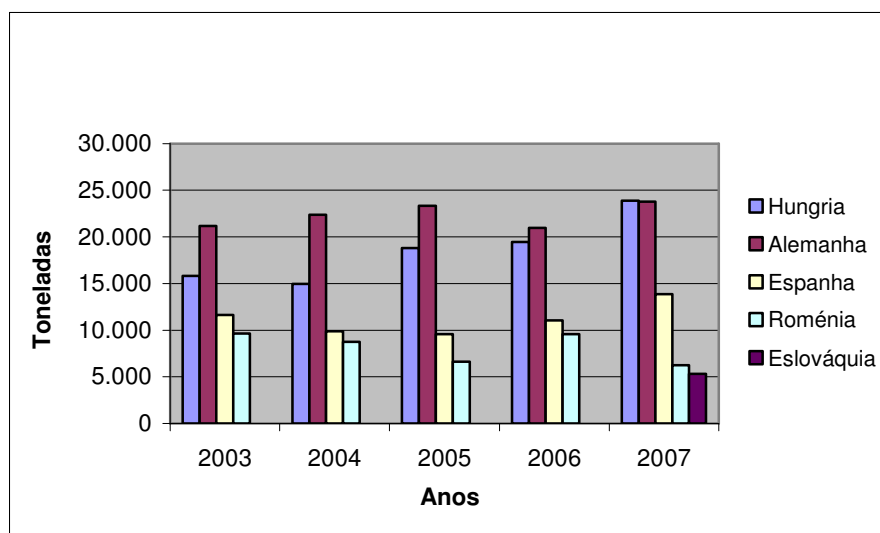
**Figura 7 – Importação de mel na Europa e UE-27**



Fonte: FAOSTAT, 2009

O maior exportador é a Hungria seguida de perto pela Alemanha e depois pela Espanha, Roménia e Eslováquia (Figura 8).

**Figura 8 – Exportação de mel na Europa e UE-27**



Fonte: FAOSTAT, 2009

Os maiores consumidores na Europa são a Alemanha, Ucrânia, Federação Russa, Reino Unido e França (Tabela 7).

**Tabela 7 – Consumo de mel na Europa**

País	2003	2004	2005	2006	2007
<b>Alemanha</b>	96.062	92.159	93.367	84.541	86.306
Ucrânia	53.550	53.236	67.648	69.039	67.700
Federação Russa	48.048	52.666	52.123	55.316	55.173
<b>Reino Unido</b>	28.867	30.893	32.980	36.180	37.309
<b>França</b>	30.165	32.081	34.261	33.121	34.869
<b>Espanha</b>	34.765	40.540	32.642	37.382	28.927
<b>Itália</b>	21.449	25.390	23.131	23.855	22.686
<b>Bélgica</b>	8.252	9.015	5.291	6.986	10.733
<b>Países Baixos</b>	9.575	7.279	11.517	10.317	8.436

Fonte: FAOSTAT, 2009, toneladas

Com base nos mesmos dados (FAOSTAT 2009), o auto aprovisionamento de mel na UE-27 é inferior a 60% e na Europa ronda os 72%.

Em 2005 o preço no mercado mundial foi de 1,6 euros/kg, o preço médio à importação na União Europeia foi de 1,29 euros/kg, o preço médio à exportação foi de 3,63 euros/kg (PAN 2008-2010).

## 1.4.2. Produção de mel em Portugal

Em Portugal existem, de acordo com dados oficiais de 2007, 15 mil apicultores registados, trabalhando em 33 mil apiários que albergam 555 mil colmeias. Em relação a 2004, verificou-se um decréscimo do número de apicultores (-30,6%), bem como um decréscimo de apiários (-3,9%) e colmeias (-4,3%) (PAN 2008-2010).

A Beira Litoral é a região onde existe maior número de apicultores, com uma média de 17,8 colmeias por apicultor. Algarve e Alentejo são regiões com menor número de apicultores mas com maior número de colmeias, 95,5 e 62,4 colmeias por apicultor, respectivamente. Os Açores são a região com menos apicultores, apiários e colmeias e a Madeira a região com apicultores de menor dimensão média, cerca de 11 colmeias por apicultor. Em média os apicultores Portugueses possuem 2,1 apiários e 36,4 colmeias. Cada colmeia produz, em média, 12,44 kg de mel (PAN 2008-2010).

Os apicultores não profissionais (95,9% do total) possuem 59,6% das colmeias (22,6 colmeias/apicultor). Os apicultores profissionais compreendem apenas 4,1% do total de apicultores mas detêm 40,4% do efectivo, com uma dimensão média de 358 colmeias por apicultor. A idade média do apicultor é de 56 anos; 64% possui escolaridade básica e 73% nunca teve qualquer formação específica na área da apicultura (PAN 2008-2010).

A actividade associativa engloba 52 entidades colectivas (36 associações de produtores, 14 cooperativas, 2 sociedades) de forte implantação regional, que em 2006 representaram 40% dos apicultores portugueses. Existe ainda a Federação Nacional dos Apicultores de Portugal (FNAP), englobando 24 entidades e representando 20% do total dos apicultores nacionais (PAN 2008-2010).

O exercício da actividade apícola carece de registo prévio na DGV, sendo obrigatória a declaração anual de existências (Decreto-Lei nº 203/2005).

As doenças de declaração obrigatória são a Loque Americana (provocada pela bactéria *Paenibacillus larvae*, afecta a criação e é muito contagiosa), a Loque Europeia (doença de criação provocada pela bactéria *Mellisococcus pluton*), a Acarapisose (doença parasitária das abelhas adultas causada pelo ácaro *Acarapis woodi*), a Varroose (doença das abelhas adultas e criação causada pelo ácaro *Varroa destructor*), a Aethinose (doença provocada por um pequeno escaravelho da colmeia, o coleóptero *Aethina tumida*, cujas larvas se alimentam do pólen, mel e larvas de abelhas conduzindo à destruição total), a Tropilaelaps (causada por ácaros *Tropilaelaps* spp., parasitam abelhas e criação) e unicamente nas zonas controladas a Ascosferiose (doença de criação causada pelo fungo *Ascospaera apis*) e a Nosemose (doença das abelhas adultas provocada pelo protozoário *Nosema*) (Decreto-Lei nº 203/2005; PAN 2008-2010; P S A 2009; FNAP, 2008).

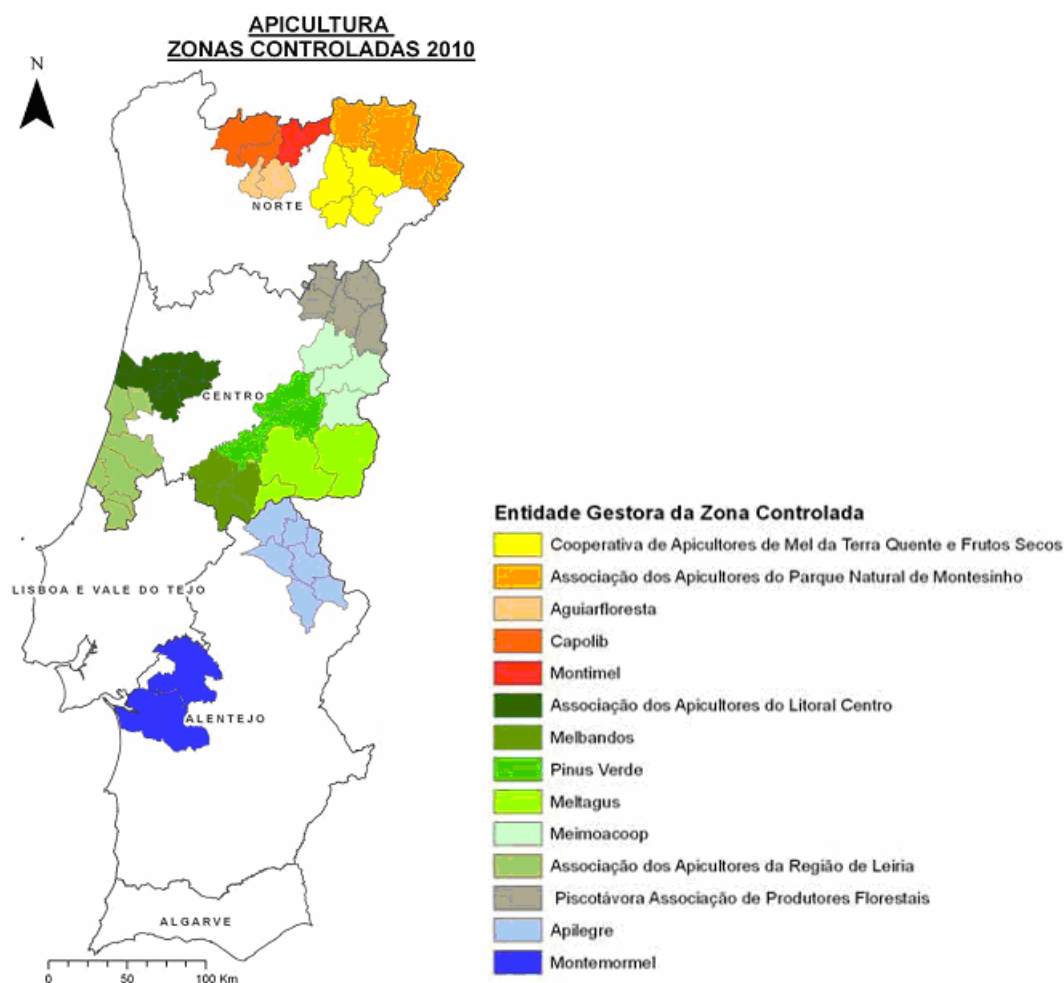
O rastreio epidemiológico, realizado em 2006, confirmou que em Portugal estão presentes várias doenças das abelhas, de forma endémica, nomeadamente varroose, loque americana,

acarapimose, ascosferiose, nosemose, senotainose (forma larvar de *Senotaina tricuspis*, mosca), amebiase (*Malpigamoeba mellifica*), e galeriose (*Galleria melonella*, traça da cera) (P S A 2009; Fórum Nacional de Apicultura, 2007).

O programa sanitário é elaborado anualmente pela DGV e nele é definido as medidas de sanidade veterinária para defesa das doenças de declaração obrigatória e também os requisitos a que devem obedecer as zonas controladas (Decreto-Lei nº 203/2005).

Existem em Portugal 14 Zonas Controladas (DGV 2010, Mapa Março 2010) (Figura 9).

**Figura 9 – Mapa das Zonas Controladas**



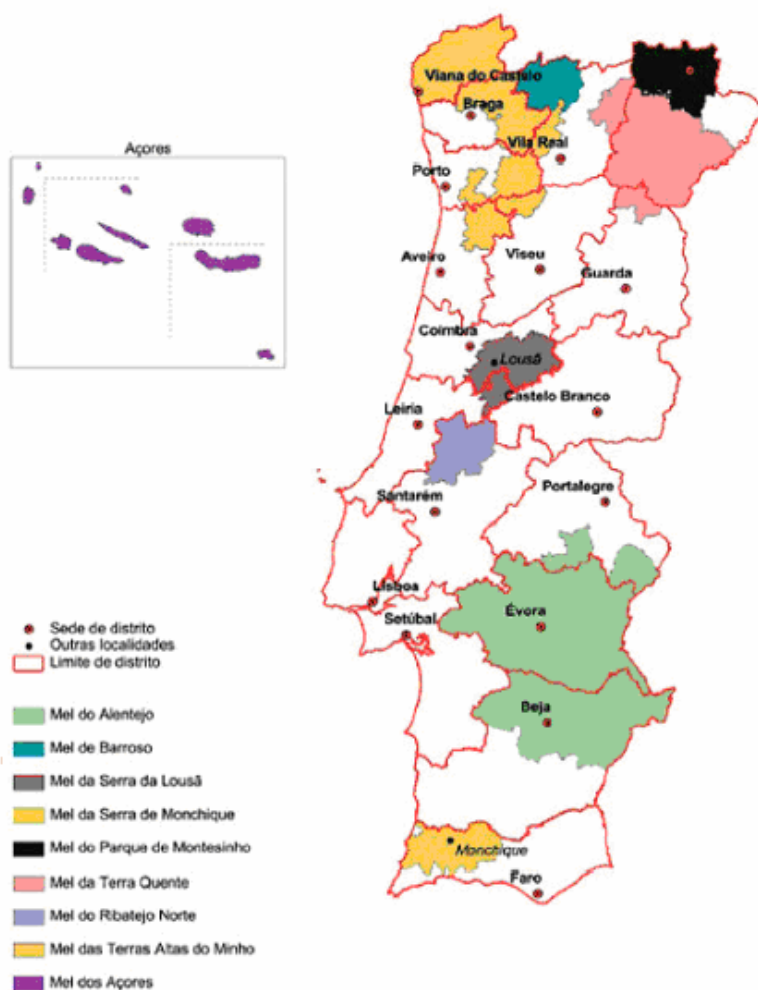
Fonte: DGV 2010, Mapa Março 2010

A criação de Zonas Controladas tem como objectivo o controlo e erradicação das doenças de declaração obrigatória das abelhas. São zonas geográficas onde se faz o controlo de forma sistemática das doenças e em que a ausência da doença não foi demonstrada. O controlo é feito por uma entidade gestora reconhecida pela DGV, a pedido de organizações de apicultores da área geográfica. As obrigações dos apicultores das zonas controladas passam por manter um registo actualizado dos factos que ocorrem na zona, possuir boletim do apiário onde são registadas as operações realizadas no apiário, proceder ao diagnóstico

das doenças de declaração obrigatória de acordo com as indicações da DGV, adoptar as medidas de controlo de acordo com o estabelecido pela DGV (movimentação na zona sobre introdução de abelhas, enxames, colónias, colmeias, materiais ou utensílios destinados à apicultura carece de autorização da DGV) (Decreto-Lei nº 203/2005).

No que se refere às Denominações de Origem Protegida (DOP) de Mel, são reconhecidas em Portugal (Figura 10) nove denominações (PAN 2008-2010).

**Figura 10 – Mapa dos Méis com Denominação de Origem Protegida**



Fonte: PAN 2008-2010

A produção de méis DOP tem vindo a aumentar mas no ano de 2005 representou apenas cerca de 2,3% da produção de mel nacional. Em relação aos méis não certificados como DOP, os preços praticados nos méis certificados com DOP são mais elevados, tendo em 2005 o preço médio/kg variado entre 7,90 € e 2,99 € (PAN 2008-2010).

O Modo de Produção Biológico (MPB) na apicultura está em franca expansão devido à procura crescente desses produtos. Em 2005 o número de colónias em MPB era de 1359 (PAN 2008-2010).

Os dados fornecidos pelo Instituto Nacional de Estatística sobre a produção e o consumo de mel em Portugal, são apresentados na Tabela 8.

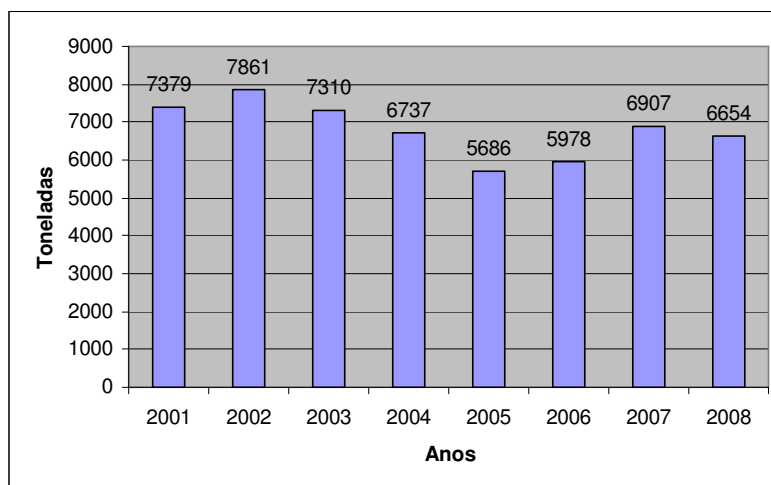
**Tabela 8 – Dados estatísticos sobre a produção e consumo de mel em Portugal**

	2004	2005	2006	2007	2008
<b>Produção (t)</b>	6737	5686	5978	6907	6654
<b>Autoaproveitamento</b>	87,5%	87,5%	100%	100%	87,5%
<b>Consumo per capita kg</b>	0,8	0,8	0,6	0,6	-

Fonte: INE, 2009

Da análise da Tabela 8 verifica-se que a produção se mantém em valores estáveis nos últimos cinco anos. A tendência nitidamente decrescente que se verificou entre 2002-2005 (-7% ao ano), já não se verifica como podemos constatar pelos dados da Figura 11 (PAN 2008-2010).

**Figura 11 – Produção de mel em Portugal 2001-2008**



Fonte: PAN 2008-2010; INE, 2009

O grau de aprovisionamento é de valores inferiores a 90% e a importação colmata as necessidades de consumo. O consumo *per capita* é de 0,8 kg por habitante/ano destinado ao consumo humano pois a utilização na indústria alimentar e farmacêutica não tem expressão (PAN 2008-2010).

O controlo de resíduos no mel fornece garantia sanitária relativamente a este produto, que juntamente com a aplicação de boas práticas de higiene em toda a cadeia de produção, vai permitir fornecer ao consumidor um produto seguro e de qualidade (PAN 2008-2010).

O controlo de resíduos é uma das exigências da legislação e o mel está incluído (Directiva 96/23 de 29 de Abril, Decreto-Lei nº 148/99 de 4 de Maio, Decisão 97/747 de 27 de Outubro). O Plano Nacional de Controlo de Resíduos (PNCR) cumpre essa exigência, com análises de amostragens aleatórias em função da produção anual (PAN 2008-2010). As substâncias a pesquisar no caso do mel são: Grupo A 6 – substâncias veterinárias não autorizadas (Quadro 2, substâncias proibidas, do Regulamento nº 37/2010); Grupo B 1 – substâncias antibacterianas, incluindo sulfamidas e quinolonas; Grupo B 2 c – carbamatos e piretróides; Grupo B 3 a – compostos organoclorados incluindo os PCB; Grupo B 3 b – compostos organofosforados; Grupo B 3 c – elementos químicos (metais pesados) (Directiva 96/23 de 29 de Abril).

No ano 2008 foram colhidas 164 amostras de mel e os resultados indicaram 1 amostra não conforme (substância antibacteriana). Nos Postos de Inspeção Fronteiriços (PIF) foram colhidas 2 amostras, as análises indicaram que uma das amostras continha substância proibida e a outra amostra continha substância antibacteriana (PNCR, 2008).

### **1.5. Informação ao consumidor – rótulo, o que deve constar**

A embalagem que vai ser fornecida ao consumidor final, deverá conter ou fazer-se acompanhar de toda a informação que a legislação exige e tem por finalidade informar de forma clara o consumidor (Decreto-Lei nº 560/1999). O produtor pode prestar outras informações que julgue pertinentes, desde que não induza o consumidor em erro.

A informação para o consumo é um dos direitos consagrados na Lei do Consumidor (Lei nº 24/1996). Toda a informação deve estar disponível em português, sem prejuízo da utilização de outros idiomas (Decreto-Lei nº 560/1999, Decreto-Lei nº 238/1986).

Assim, devem figurar no mesmo campo visual a denominação de venda, a quantidade líquida em quilograma ou grama e a data de durabilidade mínima. Deve ainda constar o nome ou firma ou denominação social, a morada do fabricante ou do embalador ou de um vendedor estabelecido na UE, as condições especiais de conservação, o local de origem ou proveniência, a indicação que permite identificar o lote precedido da letra “L”. Estas são as menções obrigatórias na rotulagem (Decreto-Lei nº 560/1999).

As denominações de venda variam consoante o tipo de mel. Assim com base na sua origem considera-se o mel de néctar ou mel de flores e o mel de melada. Com base no modo de produção e/ou apresentação, mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel

centrifugado, mel prensado, mel filtrado. Existe ainda o mel para uso industrial, em cuja rotulagem e na proximidade da denominação de venda deve constar a expressão “Apenas para uso culinário”. Estas denominações podem ser substituídas apenas por “mel”, excepto para o caso de mel filtrado, mel em favos, mel com pedaços de favos e mel para uso industrial. À denominação de venda pode ser adicionada informação sobre a origem floral ou vegetal do mel, origem regional, territorial ou topográfica ou ainda referências a critérios de qualidade específicos. As regras especiais, relativas aos méis com Denominação de Origem Protegida (DOP) e aos de Modo de Produção Biológico (MPB), deverão também ser observadas (Decreto-Lei nº 214/2003, Decreto-Lei nº 560/1999, Regulamento nº 510/2006 de 20 de Março, Regulamento nº 834/2007 de 28 de Junho).

A quantidade líquida contida na embalagem deverá ser expressa em massa, seguido do símbolo da unidade de medida utilizada, quilograma (kg) ou grama (g) (Decreto-Lei nº 214/2003, Decreto-Lei nº 560/1999, Decreto-Lei nº 199/2008).

A data da durabilidade mínima deverá constar na rotulagem. É da responsabilidade de quem elaborou o rótulo, fabricante, embalador ou vendedor na União Europeia. O período da durabilidade para o mel não está previsto em diploma legal, mas deverá ser tal que garanta que os factores de composição e qualidade sias normas legais. Deverá ser indicado o mês e o ano ou só o ano se a durabilidade for superior a 18 meses, antecedida da menção “Consumir de preferência antes do fim de...” (Decreto-Lei nº 214/2003, Decreto-Lei nº 560/1999, Codex Stan 12 – 1981, Decreto-Lei nº 199/2008).

Deverá também constar o nome ou firma ou denominação social e a morada do fabricante ou do embalador ou de um vendedor estabelecido na União Europeia, que é o responsável pelo produto e pela rotulagem (Decreto-Lei nº 560/1999). Se o apicultor é o embalador deverá constar o número de apicultor (unidade de produção primária), sujeito a registo na Direcção Geral de Veterinária; o número de registo coincide com o número de apicultor. Caso se trate de um estabelecimento, que procede à extracção ou processamento do mel ou outros produtos apícolas com destino à introdução no mercado, o licenciamento é necessário, sendo-lhe atribuído a marca de identificação, número de controlo veterinário, que deve constar na rotulagem (Decreto-Lei nº 214/2003, Decreto-Lei nº 560/1999, Decreto-Lei nº 1/2007, Regulamento nº 852/2004). Deste modo o consumidor sabe a quem contactar, em caso de reclamação ou da necessidade de informações sobre o produto.

As condições de conservação são todas as indicações que ajudem a preservar a qualidade do mel, como por exemplo conservar o produto em lugar fresco, conservar o produto ao abrigo da luz ou os cuidados a ter em relação à humidade.

O rótulo deve mencionar o país ou países de origem em que o mel foi colhido, mas esta indicação pode ser substituída por “Mistura de méis CE”, “Mistura de méis não CE”, “Mistura de méis CE e não CE” (Decreto-Lei nº 214/2003). O país de origem dos lotes que compõem o produto deve igualmente constar do rótulo (Decreto-Lei nº 1/2007).

A indicação do lote deve ser precedida da letra “L”. Diz respeito ao conjunto de unidades de venda que foi produzido, fabricado ou embalado em circunstâncias idênticas, um dos elementos fundamentais no que diz respeito à rastreabilidade. A indicação do lote é da responsabilidade do produtor, embalador ou primeiro vendedor estabelecido na União Europeia (Decreto-Lei nº 560/1999, Regulamento nº 178/2002).

De acordo com o artigo 16º do Regulamento nº 178/2002 toda a informação fornecida deve ser clara de modo a não induzir o consumidor em erro. Deve ser facilmente visível e legível, com uma redacção correcta, clara e precisa; não deve ser atribuído ao produto características que não possua (Decreto-Lei nº 560/1999).

## **1.6. Legislação referente ao mel**

A legislação relativa à rotulagem do mel foi revista no capítulo anterior.

Neste capítulo são apresentadas as peças legislativas referentes a caracterização e composição do mel (Decreto-Lei nº 214/2003), ao regime jurídico da actividade apícola e normas sanitárias de defesa contra as doenças das abelhas (Decreto-Lei nº 203/2005), a condições de higiene dos locais de extracção (Decreto-Lei nº 1/2007 e Portaria nº 699/2008), a acções de melhoria das condições de produção e comercialização dos produtos da apicultura (Regulamento nº 797/2004), aos organismos de controlo e certificação do mel DOP (Regulamento nº 510/2006) e ao Modo de Produção Biológico (Regulamento nº 834/2007, Regulamento nº 889/2008).

O mel é um produto alimentar de origem animal (Regulamento nº 853/2004) e a sua produção é considerada produção primária (Regulamento nº 178/2002; Regulamento nº 853/2004). Estão assim incluídas as operações conexas à produção de mel como a criação de abelhas, mesmo quando os apiários estão situados distantes das instalações do apicultor, a recolha e transporte dos quadros das colmeias, a extracção e o acondicionamento ou a embalagem do mel nas instalações do apicultor. Todas estas operações devem obedecer ao Anexo I do Regulamento nº 852/2004, respeitantes às disposições relativas à higiene, manutenção de registos e códigos de boas práticas). As regras do fornecimento directo, do apicultor ao consumidor final ou a estabelecimentos de comércio retalhistas, de pequenas quantidades de mel, são fixadas por cada um dos Estados Membros, o mesmo sucedendo para a definição de pequena quantidade (500 kg por ano, para o mel). Esta actividade de fornecimento directo carece de registo na DGV (Portaria nº 699/2008).

O Decreto-Lei nº 1/2007 prevê dois tipos de processos, de registo ou de aprovação, consoante a classificação do estabelecimento que é determinada pela origem e destino do

produto: unidades de produção primária e estabelecimentos. Os estabelecimentos são os que procedem à extracção ou processamento de mel ou outros produtos apícolas, com destino à introdução no mercado. Os estabelecimentos carecem de aprovação, concedida no âmbito do processo de licenciamento, e respectiva atribuição da marca de identificação. As unidades de produção primária, procedem às operações conexas em mel ou outros produtos apícolas provenientes da sua própria exploração, com destino aos estabelecimentos ou ao consumidor final ou ao comércio a retalho local nos limites do distrito de implantação da unidade ou em representações temporárias de produtos regionais. A unidade de produção primária carece de registo e o número de registo é coincidente com o número de apicultor. Os estabelecimentos deverão obedecer ao Anexo II do Regulamento nº 852/2004 (requisitos gerais de higiene aplicáveis a todos os operadores das empresas do sector alimentar) devendo implementar um programa de segurança alimentar através da implementação de um programa de pré requisitos e um plano HACCP (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo).

O Decreto-Lei nº 214/2003 transpõe a Directiva 2001/110/CE, relativa ao mel. No seu Anexo I define mel, principais tipos de mel consoante a origem (mel de néctar ou mel de flores e mel de melada) ou consoante o modo de produção e/ou apresentação (mel em favos, mel com pedaços de favos, mel escorrido, mel centrifugado, mel prensado, mel filtrado). O Anexo II diz respeito aos critérios de composição dos méis, como referido na Tabela 2.

O regime jurídico da actividade apícola e as normas sanitárias para a defesa contra as doenças das abelhas são estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 203/2005. Refere os registos da actividade apícola (registo do apicultor na DGV, registo e condições de comércio da cera de abelha), a localização dos apiários (implantação e densidade de implantação), base de dados informatizada relativa ao efectivo apícola e comunicações às entidades competentes, sanidade apícola (doenças de declaração obrigatória, programa sanitário), zonas sanitárias (reconhecimento e obrigações nas zonas controladas) e as sanções. Os modelos de registo constam do Despacho nº 3838/2006 e as indemnizações a atribuir aos produtores apícolas na sequência de abates sanitários do Despacho nº 14 536/2006. As condições de polícia sanitária estão definidas na Directiva 92/65/CEE e Decisão 2003/881/CE e suas alterações.

As acções de melhoria tendo em vista melhorar as condições de produção e comercialização dos produtos da apicultura são estabelecidas no Regulamento nº 797/2004 e para o efeito cada Estado deverá elaborar um programa nacional para um período de três anos (em Portugal – Programa Apícola Nacional Triénio 2008-2010). As acções incluídas são assistência técnica aos apicultores e seus agrupamentos, racionalização da transumância, medidas de apoio aos laboratórios de análise das propriedades físico-químicas do mel, medidas de apoio ao repovoamento do efectivo apícola, colaboração com programas de investigação na área da apicultura e produtos de apicultura.

Em relação aos méis com Denominação de Origem Protegida (DOP) o Regulamento nº 510/2006 estabelece o quadro jurídico; o Modo de Produção Biológico (MPB) é regido pelo Regulamento nº 834/2007 e pelo Regulamento nº 889/2008 de 5 de Setembro.

## **1.7. Contaminantes do mel**

Define-se como contaminante todas as substâncias que não foram intencionalmente adicionadas aos alimentos. Podem estar presentes durante a produção, embalagem, transporte ou armazenamento e podem também resultar de contaminação ambiental. Como a sua presença nos alimentos tem geralmente um impacto negativo na saúde dos consumidores a UE tomou medidas para minimizar a sua presença (limites máximos, monitorização, sistema de alerta, promoção de boas práticas, investigação) (Comissão Europeia, 2008).

O mel apesar de produto natural, é produzido num ambiente mais ou menos poluído. Os contaminantes do mel podem ser oriundos do ambiente (com fonte agrícola ou ambiental propriamente dita) ou das práticas apícolas, nomeadamente resíduos provenientes de produtos de tratamento das doenças das abelhas, dos materiais da colmeia, da cera contaminada, dos protectores da madeira, do equipamento usado na extracção de mel (Bogdanov, 2006; Rissato, Galhiane, Almeida, Gerenuti, Apon, 2007; Rial-Otero, Gaspar, Moura, Capelo, 2007; Kujawski & Namiésnik, 2008).

### **1.7.1. Contaminantes de natureza química**

O néctar, a melada, o pólen e os exsudados das plantas são as matérias-primas dos produtos das abelhas e podem estar contaminadas por xenobióticos presentes no ar, água, plantas e solo sendo depois transportadas para a colmeia pelas abelhas (Bogdanov, 2006).

#### **1.7.1.1. Metais pesados**

O ar e o solo contêm metais pesados, provenientes da indústria, incineradoras e motores dos carros entre outros, que podem contaminar as abelhas e os seus produtos.

O cádmio ocorre naturalmente no ambiente como resultante de emissões vulcânicas e erosão das rochas, ainda que outras actividades também o possam libertar para o ambiente como a incineração do lixo, a queima de combustíveis fósseis ou o uso de fertilizantes que o contenham. Qualquer destas fontes pode originar contaminação do ambiente e o cádmio ser

transportado do solo para as plantas e contaminar o néctar. Uma pequena porção pode ser transportada por via aérea, principalmente na vizinhança de incineradoras e metalúrgicas (Jones, 1987; Bogdanov, 2006; EFSA, 2009; Pohl, 2009).

Não existem valores de LMR estabelecidos para o mel. Os valores de cádmio que têm sido detectados em mel situam-se entre 0,001 e 0,113 mg/kg (Bogdanov, 2006).

Os perigos para a saúde humana estão associados com a sua eliminação muito lenta (semi-vida de 10 a 30 anos), além de efeitos graves no sistema urinário e ósseo (EFSA, 2009). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou o cádmio e os seus compostos no Grupo 1, carcinogénico para humanos (IARC, 2009).

O chumbo geralmente não é transportado pelas plantas. Transportado pelo ar, com origem principalmente dos combustíveis dos motores, atinge directamente o néctar. Não há valores de LMR estabelecidos para o mel. Os valores de chumbo que têm sido detectados no mel situam-se entre 0,001 e 1,8 mg/kg. Espera-se que a contaminação por chumbo diminua devido ao uso de outro tipo de motores e de combustíveis. Dados Suíços de 1984 apresentam uma concentração no mel de 0,2 mg/kg, enquanto que dados de 2000 a 2002 apresentam uma concentração de 0,04 mg/kg (Bogdanov, 2006). A contaminação do mel em áreas poluídas e não poluídas não é significativamente diferente, mas valores mais elevados têm sido detectados em mel proveniente de áreas poluídas (Bogdanov, 2006). As repercussões na saúde humana, estão relacionados com efeitos crónicos no sistema digestivo (cólicas), sistema sanguíneo (anemia), sistema cardiovascular (elevação da pressão sanguínea) e repercussões no neurodesenvolvimento fetal com diminuição da capacidade de aprendizagem em crianças (SCOOP, 2004). A IARC (2009) classificou o chumbo inorgânico no Grupo 2 A, agente provavelmente carcinogénico para humanos e o chumbo orgânico no Grupo 3 (não é classificável em relação à sua carcinogenicidade em humanos com base em evidência inadequada dos estudos em humanos e animais).

Níquel e mercúrio têm sido estudados em mel. Os valores de níquel detectados em mel variam de 0,004 a 3,23 mg/kg e os valores de mercúrio entre 0,0005 e 0,212 mg/kg (Bogdanov, 2006).

#### 1.7.1.2. Radioactividade

A maior parte dos isótopos radioactivos encontrados em mel são o isótopo de potássio  $^{40}\text{K}$  e o isótopo de cézio  $^{137}\text{Cs}$  (expressa-se em Becquerel por kg, Bq/kg). A radioactividade não é um problema corrente em mel, mas após acidentes termonucleares os produtos devem ser controlados antes do seu consumo (Bogdanov, 2006).

Após o acidente de Chernobyl (26 de Abril de 1986), o Regulamento nº 737/1990 fixou um limite máximo de 370 Bq/kg para leite e produtos lácteos e 600 Bq/kg para todos os outros produtos alimentares.

#### 1.7.1.3. PCB's – contaminantes orgânicos

Os compostos bifenilpoliclorados (PCB's), juntamente com pesticidas (aldrina, dieldrina, endrina, clordano, DDT, heptocloro, toxafeno, murex, hexaclorobenzeno, hexaclorociclohexano) e substâncias resultantes de processos industriais (dioxinas e furanos) formam o grupo dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP's), que são substâncias químicas, que persistem no ambiente, bioacumulam-se através da cadeia alimentar e podem causar efeitos adversos na saúde humana e no ambiente (WHO-Europe, 2003).

As quantidades de compostos bifenilpoliclorados encontrada em mel são normalmente baixas e seguras (Bogdanov, 2006).

A UE recomendou (Recomendação da Comissão 2006/88/CE) que os países devem investigar e identificar a fonte de contaminação e tomar medidas para reduzir ou eliminar essa fonte.

#### 1.7.1.4. Pesticidas usados na agricultura

**Pesticida** é uma substância ou mistura de substâncias que anula, destrói, repele ou diminui a capacidade de um organismo competir com outros. Podem ser classificados de acordo com o alvo de acção, o organismo específico a ser controlado ou eliminado (insecticida, acaricida, fungicida, rodenticida, herbicida), ou com a acção química (organofosforado, organoclorado, carbamatos, piretróides, etc.) (Santos, 2002).

O Regulamento nº 396/2005, define resíduos de pesticidas como os resíduos, incluindo substâncias activas, metabolitos e/ou produtos de degradação ou de reacção de substâncias activas utilizadas actualmente ou anteriormente em produtos fitofarmacêuticos (definido na Directiva 91/414/CEE), presentes no interior ou à superfície dos produtos enumerados no Anexo I do Regulamento nº 396/2005, incluindo, nomeadamente, os que possam surgir como resultado de uma utilização fitossanitária, em medicamentos veterinários ou como biocidas. O objectivo é salvaguardar quer o ambiente quer a saúde pública. O Anexo I, publicado no Regulamento nº 178/2006, enumera os géneros alimentícios e os alimentos para animais aos quais se aplicam limites máximos de resíduos de pesticidas e o mel está enumerado nesse Regulamento. O Limite Máximo de Resíduos (LMR) é o limite máximo legal de concentração de um resíduo de pesticida no interior ou à

superfície de géneros alimentícios ou alimentos para animais, fixada com base em BPA (Boas Práticas Agrícolas) e na menor exposição possível dos consumidores necessária para proteger os consumidores vulneráveis (Regulamento nº 396/2005).

Os insecticidas que têm sido examinados em méis europeus incluem-se nos grupos dos organoclorados, organofosforados e carbamatos.

### Organoclorados

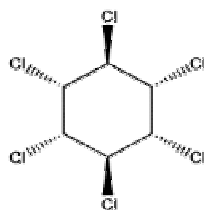
Os organoclorados são derivados do clorobenzeno, ciclohexano ou do ciclodieno. São utilizados como insecticidas, acaricidas, nematocidas e fungicidas. Interferem na transmissão axónica do impulso nervoso devido ao bloqueio dos canais de sódio, impedindo assim a saída do potássio intracelular, que conduz a uma redução do limiar da membrana. Possuem na sua composição hidrogénio, carbono e cloro. São caracterizados pela sua alta lipofilicidade e estabilidade química, de onde resulta um prolongado efeito residual, alta persistência no ambiente e bioacumulação. Pertencem a este grupo, entre outros, o DDT (diclorodifeniltricloroetano), HCH (hexaclorociclohexano) e seus isómeros ( $\alpha$ -HCH,  $\beta$ -HCH,  $\gamma$ -HCH), aldrina e dieldrina, clordano e toxafeno (Santos, 2002).

O lindano foi um dos pesticidas escolhidos para a realização da sua detecção no mel.

**Lindano** é o isómero gama ( $\gamma$ -HCH) do hexaclorociclohexano, é um composto organoclorado com o número CAS (*Chemical Abstract Service*) 58-89-9, fórmula molecular  $C_6H_6Cl_6$  (Figura 12) (WHO, 2004).

Foi usado como insecticida de largo espectro para tratamento de sementes, aplicações foliares, tratamento de árvores e madeira e contra ectoparasitas em aplicações veterinárias e humanas. Devido às suas propriedades físico-químicas (suficientemente volátil, solubilidade na água), pode ser transportado a longas distâncias sendo encontrado em locais onde nunca foi usado (Ártico). É um poluente orgânico persistente. Acumula-se no ar, água, solo e na cadeia alimentar, já que sendo lipossolúvel, permite bioacumulação (WHO-Europe, 2003; POPRC, 2007).

Figura 12 – Fórmula do Lindano



Actua inibindo o impulso nervoso normal por competição com o neurotransmissor ácido gamma-aminobutírico (GABA), bloqueia a porta de entrada dos canais de cloro dos neurónios e impede a passagem do impulso nervoso normal, que resulta em actividade

neuronal excessiva. GABA é o principal neurotransmissor inibidor de insectos e mamíferos (Casida & Quistad, 2004).

A WHO (*World Health Organization*) classificou o lindano no grupo Classe II, moderadamente perigoso, com DL<sub>50</sub> de 88 mg/kg (WHO, 2004).

A IARC classificou lindano no grupo 2B, possivelmente carcinogénico para humanos (IARC-2009).

O LMR do lindano no mel é de 0,01 µg/kg (Regulamento nº 149/2008).

O seu uso foi proibido na União Europeia em 2000 (Decisão da Comissão 2000/801).

## Organofosforados

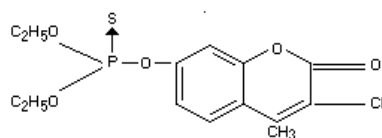
Surgiram da tecnologia química utilizada para desenvolver gases de guerra durante a Segunda Guerra Mundial. Quimicamente são ésteres do ácido fosfórico. De um modo geral são mais tóxicos para os vertebrados que os organoclorados, mais instáveis quimicamente e não persistem no meio ambiente (Santos, 2002).

No grupo dos organofosforados estão incluídos todos os insecticidas que contêm fósforo.

Pertencem a este grupo, entre outros, o paratião, malatião, diazinão, diclorvos, cumafos. O cumafos foi um dos pesticidas escolhidos para a realização da sua detecção no mel.

**Cumafos** é um composto organofosforado, com o número CAS 56-72-4 (WHO, 2004), fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>ClO<sub>5</sub>P<sub>5</sub> (Figura 13).

Figura 13 – Fórmula do Cumafos



Actua como inibidor irreversível da acetilcolinesterase, concentrada nas terminações nervosas dos nervos colinérgicos e responsável pela hidrólise da acetilcolina, que é o principal neurotransmissor excitador do sistema nervoso central e do sistema nervoso periférico dos mamíferos, mas só do sistema nervoso central dos insectos. Os organofosforados, actuando como inibidores, causam acumulação da acetilcolina de que resulta uma excessiva estimulação dos receptores colinérgicos (EMEA, 2001; Casida & Quistad, 2004).

A WHO (2004) classificou o cumafos no grupo Classe IB, altamente perigoso, com DL<sub>50</sub> de 7,1 mg/kg.

É utilizado com a intenção de controlar a varoose, doença das abelhas provocada por um ácaro, *Varroa destructor*, que contamina crias e abelhas adultas (DGV, 2009).

Consta da listagem (27 de Abril de 2009) dos Produtos de Uso Veterinário com autorização de venda em Portugal, para uso como acaricida nas abelhas (produto comercial Perizin, APV nº 28/88 DGP) e como anti-parasitário externo nas espécies pecuárias e no cão.

Quando aplicado numa colónia de abelhas, pelo menos um quarto da quantidade total aplicada atinge o aparelho digestivo das abelhas. A transferência entre abelhas também ocorre e concentra-se no mel e na cera (EMEA, 2001).

O LMR de cumafos no mel é de 100 µg/kg de acordo com o Regulamento nº 37/2010.

O resíduo marcador é cumafos pois os seus metabolitos (chlorferron, coroxon, potasan) estão abaixo do limite de detecção do método analítico. O método proposto para determinação quantitativa é a Cromatografia Gasosa com detector de captura electrónica (GC-ECD) (EMEA, 2001).

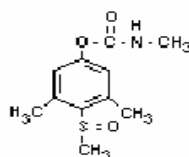
### Carbamatos

Grupo de pesticidas que incluem compostos que funcionam como insecticidas, herbicidas, fungicidas e anti bacterianos. Foram desenvolvidos a partir de produtos naturais, nomeadamente sementes de *Calabar* (*Physostigma venenosum*) cujo princípio activo é a fisiostigmina vulgarmente conhecido por eserina, derivado do ácido carbâmico. Pertencem a este grupo, entre outros o primicarb, aldicarb, carbaril, metiocarbe. Actuam por inibição reversível da acetilcolinesterase, enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina. Os efeitos são semelhantes aos da exposição aos organofosforados. O efeito dos carbamatos é de duração mais curta, porque o complexo formado entre o carbamato e a enzima se decompõe facilmente (Santos, 2002).

O metiocarbe sulfóxido foi um dos pesticidas escolhidos para a realização da sua detecção no mel. **Metiocarbe sulfóxido** (CAS nº 2635-10-1) (Figura 14) é um composto carbamato produto de degradação do Metiocarbe (CAS nº 2032-65-7), bem como o Metiocarbe sulfona (CAS nº 2179-25-1).

A WHO (2004) classificou o metiocarbe no grupo Classe IB, altamente perigoso, com DL<sub>50</sub> de 20 mg/kg.

**Figura 14 – Fórmula do Metiocarbe sulfóxido**



As autorizações de venda do metiocarbe dizem respeito ao seu uso como repelente no tratamento de sementes, insecticida e moluscicida (Directiva 91/414/CEE). Consta da Listagem de Produtos Fitofarmacêuticos com autorização de venda em Portugal (12 de

Novembro de 2009) com os produtos comerciais Draza (APV 3632), Mesurol 50 (APV 3633) e Mesurol anti lesma (APV 3660).

O LMR do metiocarbe (soma de metiocarbe, metiocarbe sulfóxido e sulfona, expressa em metiocarbe) no mel é de 0,05 µg/kg (Regulamento nº 839/2008).

#### 1.7.1.5. Contaminantes provenientes das práticas apícolas

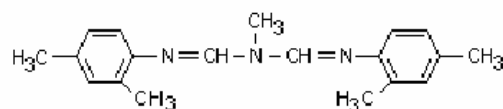
Vários produtos são usados com a intenção de controlar as doenças das abelhas, constituindo uma fonte importante de contaminação do mel.

#### **Acaricidas**

Os produtos mais utilizados pelos apicultores são o cymiazol, tau-fluvalinato, amitraz, flumetrina e cumafos. Utilizados no controle da *Varroa destructor*, são uma fonte importante de contaminação. Após os tratamentos, estes acaricidas sintéticos acumulam-se na cera (são lipossolúveis) e contaminam o mel (Bogdanov, 2006).

O **amitraz** foi um dos pesticidas escolhidos para a realização da sua detecção no mel (Figura 15). É uma formamida, insecticida e acaricida, Nº CAS 33089-61-1.

**Figura 15 – Fórmula do Amitraz**



O mecanismo de acção está relacionado com actuação nos receptores da octopamina (neurotransmissor excitador), agem como agonistas da octopamina, ligando-se aos seus receptores e aumentando o estado de excitação do organismo alvo (Santos, 2002).

A WHO classificou o amitraz no grupo Classe III, levemente perigoso, com DL<sub>50</sub> de 800 mg/kg (WHO, 2004).

O amitraz é usado como pesticida nos pomares, campos de algodão e em aplicações tópicas no controle de ectoparasitas do gado. Não consta da lista de substâncias activas autorizadas em produtos fitofarmacêuticos (Directiva 91/414).

Em apicultura o amitraz é usado para o controlo da varoos. O produto comercial com autorização de venda em Portugal (APU nº41/96 DGV) é o Apivar (Produtos de Uso Veterinário Autorizados, de 27 de Abril de 2009).

O LMR no mel é de 200 µg/kg e compreende a soma de amitraz e de todos os seus metabolitos com a fracção 2,4-DMA, expressa sob a forma de amitraz (Regulamento nº 37/2010).

A EMEA (*European Medicines Agency*) indica como método de análise a Cromatografia Gasosa com Detector de Captura Electrónica (GC-ECD) com limite de quantificação 50 µg/kg para o mel e cera (EMEA, 1999).

Devido ao aparecimento de resistências aos acaricidas sintéticos os apicultores recorreram a medidas alternativas usando substâncias não tóxicas como timol e ácidos orgânicos (oxálico e fórmico); estes ocorrem também naturalmente no mel. Usados adequadamente os resíduos no mel são baixos e seguros, não conferindo sabores estranhos ao produto (Bogdanov, 2006).

### **Antibióticos**

Resíduos de antibióticos no mel podem ser provenientes do tratamento de doenças das abelhas como a Loque Americana e a Loque Europeia. Tratamentos com antibióticos não são permitidos na UE, o que pode não acontecer em países terceiros. Assim, não foram estabelecidos LMR para antibióticos no mel e não é permitida a venda de mel com resíduos de antibióticos (Regulamento nº 37/2010; Bogdanov, 2006).

### **Outras substâncias usadas na apicultura**

Substâncias usadas para o controlo da traça da cera, como o *para*-diclorobenzeno e o naftaleno, podem contaminar também o mel.

Protectores da madeira usada nas colmeias e tintas podem igualmente contaminar a cera e o mel.

Contentores inapropriados de armazenamento também podem originar resíduos no mel, nomeadamente metais pesados. A semicarbazina, oriunda das tampas das embalagens de mel, poderá também estar presente (Bogdanov, 2006).

### **1.7.2. Contaminantes microbiológicos**

O mel é um alimento que apresenta pH ácido, humidade e actividade da água baixa (*aw*), viscosidade elevada, concentração de açúcares e pressão osmótica alta, condições que fazem com que o mel tenha um substrato pouco favorável ao desenvolvimento bacteriano. Por outro lado, o mel tem propriedades distintas que inibem ou destroem a maior parte dos microrganismos. Os microrganismos que poderão estar presentes no mel são os que suportam a concentração elevada de açúcar, acidez e carácter antimicrobiano do mel, principalmente leveduras, fungos e bactérias formadoras de esporos. Nunca foram isoladas do mel formas vegetativas de espécies bacterianas potencialmente patogénicas e o crescimento bacteriano em mel não foi relatado (Snowdon & Cliver, 1996; Martins, Martins, Bernardo, 2003).

As fontes de contaminação primária incluem pólen, tracto digestivo das abelhas, pó, ar, sujidade e néctar das flores, as quais são difíceis de controlar. As fontes de contaminação secundária são as mesmas dos outros alimentos, como os manipuladores através de feridas infectadas, espirros e contaminação fecal; a contaminação cruzada a partir de animais ou produtos animais; o equipamento, a partir de resíduos de alimentos ou água; estas fontes são controladas pela implementação de Boas Práticas de Fabrico (Snowdon & Cliver, 1996).

Os **fungos** estão associados ao conteúdo intestinal das abelhas, à colmeia e ao ambiente onde as abelhas colhem o néctar.

Tysset *et al.* (1970), citado por Snowdon e Cliver (1996), detectou em mel *Ascosphaera*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Penicillium*, com uma média de média 250 ufc/g de mel, e uma variação de 0 a 2500 ufc/g. Os mesmos autores (citando Piana *et al.*, 1991) afirmam que em amostras de mel italiano, os níveis de fungos encontrados foram muito baixos, de 1 a 43 ufc/g de mel.

Nenhum dos fungos listados como podendo sobreviver em ambientes com uma actividade da água da ordem de 0,7-0,605 (*Chrysosporium*, *Eurotium*, *Monascus*, *Xeromyces bisporium*) foram isolados de mel ou abelhas. Outros factores para além da pressão osmótica e a actividade da água baixa podem ser importantes na explicação de como os fungos aparecem no mel (Snowdon & Cliver, 1996).

Um estudo, realizado por Martins *et al.* (2003), utilizando 80 amostras de mel multifloral colhidas aleatoriamente a partir do comércio não especializado da cidade de Lisboa, identificou três géneros de bolores: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor*. Estas espécies, potencialmente patogénicas, e a contaminação por toxinas (micotoxinas) constituem um perigo, pois entre as micotoxinas, as aflatoxinas constituem uma ameaça à saúde humana pois são toxigénicas, carcinogénicas, e teratogénicas, para além de representarem perdas económicas devido à contaminação de alimentos. No referido estudo não se detectaram aflatoxinas em qualquer amostra.

Snowdon e Cliver (1996) concluem que as contagens elevadas de fungos podem ser indicativas de contaminação recente, oriunda talvez do ambiente que rodeia o local onde as abelhas colhem o néctar, da colmeia ou do equipamento de processamento do mel. Estes podem encontrar-se no mel mas não se multiplicam.

As principais **leveduras** encontradas no mel pertencem ao género *Saccharomyces*, ainda que outros géneros tenham também sido referidos como por exemplo *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Oosporidium*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Trichosporum*, *Nematospora*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, *Torula* e *Zygosaccharomyces*.

Constituem um problema no que diz respeito ao mel pois podem crescer em ambiente ácido e não são inibidas pela sacarose, podem crescer com o nível de água que existe no mel e

provocar a sua fermentação. As condições que favorecem a fermentação do mel são o aumento de humidade, temperatura moderada, granulação, contagem de leveduras elevadas, presença de cinzas e azoto. A fermentação ocorre geralmente em ambientes como o cimo dos contentores de armazenamento do mel onde o conteúdo em água se encontra elevado, a concentração de leveduras é proporcional à quantidade de água disponível e a fermentação é proporcional à concentração de leveduras. Estão envolvidas em actividades de deterioração do mel pela produção de enzimas, produção de toxinas, conversão metabólica do alimento, produção de factores inibitórios para microrganismos competidores, para além de que o mel com contagem elevada de leveduras não é palatável nem vendável o que tem repercussões económicas.

A contagem de leveduras em amostra de mel recolhidas no mercado geralmente não excede algumas centenas de ufc/g, mas têm sido encontradas variações de 1 a 3500 ufc/g (Snowdon & Cliver, 1996).

No estudo de Martins *et al.* (2003) as espécies de leveduras identificadas (*Candida humicola* e *Saccharomyces* sp.) foram detectadas com uma frequência elevada e com níveis altos de contaminação, 75% das amostras continham *Candida humicola* num teor entre  $10^3$  e  $10^4$  ufc/g e 88,8% das amostras continham *Saccharomyces* num teor de contaminação entre  $10^3$  e  $10^4$  ufc/g. Conclui que estes microrganismos são provavelmente bons indicadores da qualidade microbiológica do mel.

A contagem de **bactérias** aeróbias em amostras recolhidas no mercado revelou contagens entre 83 ufc/g e 227 ufc/g e dados da indústria indicam que a variação se situa entre 1 e 500 ufc/g. Foram encontradas *E. coli*, *Enterococcus*, clostrídeos sulfito redutores, *Staphylococcus* e muitas outras espécies em estudos de vários autores. A variação do número de bactérias parece depender do tipo de amostra (mel em favos, mel recém extraído, mel do mercado), da idade do mel, tempo da cresta e do método analítico. Estas formas vegetativas parecem ter sido introduzidas no mel por contaminação secundária (o que explica também as contagens elevadas por vezes encontradas) e aparecem no mel de forma esporádica (Snowdon & Cliver, 1996).

Nenhuma forma vegetativa de espécies bacterianas causadoras de doença foi encontrada no mel (Snowdon & Cliver, 1996). Devido às suas características (70-80% de açúcares, pH entre 3-4) o mel permite a sobrevivência de flora esporulada (Monetto *et al.*, 1999).

Esporos bacterianos, particularmente os do género *Bacillus*, são regularmente encontrados no mel, em níveis variando entre 1 e 67 esporos/g. A espécie predominante foi *B. cereus* (em 48% das amostras), mas também foi encontrado *B. coagulans*, *B. megatorium* e *B. alvei* (Snowdon & Cliver, 1996).

Num estudo efectuado em 433 amostras de mel da Argentina, 27% das amostras mostraram conter *Bacillus cereus* e 14% *Bacillus* spp. Os resultados mostraram uma grande

diversidade entre os isolados o que poderia estar relacionado com várias origens da contaminação bacteriana, como pólen, abelhas, cera, equipamento e pó. O mel não tem estado implicado em surtos de doença causados pelo *B. cereus* (López & Alippi, 2007).

A incidência de esporos de *Clostridium botulinum* no mel tem sido estudada pois são frequentemente relacionados com a incidência de botulismo infantil (EC, 2002).

O botulismo infantil foi reconhecido como entidade clínica e epidemiológica distinta em 1976. Ocorre em crianças com idade inferior a 12 meses como resultado de absorção da toxina botulínica a partir do tracto intestinal e o mel foi o único alimento implicado (Midura, Snowden, Wood, Arnon, 1979). Dados laboratoriais e epidemiológicos demonstraram que o botulismo infantil resulta da ingestão de organismos produtores de toxina botulínica (Midura, 1996). Na criança, os esporos botulínicos podem germinar, colonizar o intestino e libertar a toxina. A dose tóxica para humanos é desconhecida, mas sabe-se que para os ratos é menor que 0,1 ng/kg constituindo um dos venenos naturais mais tóxicos (Gibbs, 2002).

Alguns estudos indicam que esporos botulínicos podem ser detectados em cerca de 5% das amostras de mel, sendo os teores encontrados geralmente inferiores a 1 esporo/g de mel. A contagem de esporos é mais comum em amostras provenientes directamente dos apiários (23%), seguida por amostras provenientes dos tambores de mel (18%) e por fim amostras provenientes do comércio (5%). O crescimento do *Clostridium botulinum* em mel nunca foi demonstrado (Snowdon & Cliver, 1996).

Num estudo efectuado na Argentina, usando 45 amostras de mel de marcas comerciais, foi detectada toxina botulínica e *C. botulinum* em 7% das amostras. Em duas amostras foi identificado *C. botulinum* tipo A (uma das amostras esteve implicada num caso de botulismo infantil) e noutra amostra *C. botulinum* tipo F. Foi detectado ainda *Bacillus cereus* em 78% das amostras, com baixas contagens de até 10 000 esporos/kg (Monetto *et al.*, 1999).

Num outro estudo efectuado em méis produzidos em países Nórdicos (Dinamarca, Noruega, Suécia) e em amostras provenientes directamente das colmeias e mel após extracção foram detectados esporos de *C. botulinum* tipo B (Dinamarca e Noruega) e tipo E (Suécia), (Nevas, Lindström, Hautamäki, Puoskari & Korleala, 2005). Realçam a alta prevalência de *C. botulinum* na Dinamarca, que relacionaram com a elevada população de suínos (Nevas *et al.*, 2005) e foi também isolado dos solos, pois os estudos indicam o ambiente como fonte de esporos de *C. botulinum* e geralmente o organismo que causou botulismo infantil é encontrado no solo e área onde a doença ocorreu (Midura, 1996).

Esporos de *Clostridium botulinum* podem estar presentes no mel, mas não podem germinar e produzir a toxina. Alguns casos, embora raros, de botulismo infantil podem ser explicados pela ingestão de mel, pelo que o mel não deve ser consumido por crianças com idade inferior a um ano (Bogdanov, 2006). Esta indicação poderá com vantagem constar da rotulagem ainda que não seja obrigatório na legislação da UE.

A Comissão Europeia analisou os perigos do *Clostridium botulinum* no mel e concluiu não ser necessário efectuar o exame microbiológico ao mel uma vez que a incidência é relativamente baixa e as análises microbiológicas não previnem a ocorrência do botulismo infantil (EC, 2002).

Foram realizados estudos sobre a sobrevivência de bactérias patogénicas no mel, com a introdução de formas vegetativas que não estão normalmente presentes no mel. A perda de viabilidade variou desde alguns dias até dois anos, com os autores a chamar a atenção para a necessidade de não se introduzir esses organismos no mel e para a precaução na sobreestimação das propriedades antimicrobianas do mel (Snowdon & Cliver, 1996).

Esporos de *Bacillus* e *Clostridium*, além de bolores e leveduras são, então, geralmente encontrados no mel. Os fungos e leveduras são os únicos microrganismos que têm sido relatados com possibilidade de crescer no mel (Snowdon & Cliver, 1996). Algumas bactérias podem sobreviver, no mel mas não crescer; os esporos podem persistir indefinidamente (López & Alippi, 2007). Formas vegetativas de bactérias patogénicas nunca foram encontradas no mel, mas se introduzidas podem sobreviver por períodos longos, principalmente a baixas temperaturas. A sobrevivência microbiana pode ser influenciada pelo tipo de mel e o conteúdo em água (Snowdon & Cliver, 1996).

### **1.7.3. Detecção de contaminantes**

#### **1.7.3.1. Detecção de resíduos de pesticidas no mel**

Portugal em 2003 foi o país Europeu (UE-27) que consumiu mais produtos fitofarmacêuticos (predominando os produtos fungicidas), mais de 6 kg de ingrediente activo por hectare de área agrícola utilizada. Em 2005 foi o 4º país Europeu com maior venda de pesticidas, mais de 4 kg de ingrediente activo por hectare de área agrícola utilizada. Estes valores justificam que deva ser dada especial atenção ao nível de poluição do solo e da água e ao impacto dos fitofarmacêuticos nos insectos e invertebrados (Eurostat Pocketbooks, 2008; Eurostat Yearbook, 2009).

A crescente procura de alimentos mais saudáveis e seguros, para atender a um consumidor cada vez mais exigente, tem conduzido a que os resíduos de pesticidas sejam dos mais investigados e estudados, devido quer ao seu amplo uso quer à sua toxicidade. Assim têm sido desenvolvidos vários estudos no sentido de encontrar métodos analíticos eficientes que detectem e quantifiquem esses resíduos em concentrações cada vez mais baixas.

Várias técnicas de cromatografia têm sido usadas para detectar, identificar e quantificar resíduos de pesticidas no mel. Os aspectos a ter em consideração são os padrões de pesticidas, o pH durante a extracção, o efeito da matriz, a técnica de extracção e a escolha do método cromatográfico para identificação e quantificação.

A qualidade das **soluções padrão de pesticidas** é influenciada pela luz, solvente utilizado na sua preparação, temperatura e tempo de armazenamento. Devem ser protegidas da luz e a escolha do solvente para a sua preparação deve ser cuidadosamente avaliada para evitar a degradação dos padrões. Os padrões apresentam maior estabilidade quando preparados em n-hexano do que em metanol. A temperatura de armazenamento das soluções padrão de pesticidas tem também importância e deve ser de 4 °C. Para prevenir erros superiores a 2% as soluções padrão devem ser inutilizados ao fim de 30 dias. Em relação ao amitraz a velocidade de formação de produtos de degradação é mais rápida, pelo que a solução padrão deve ser preparada diariamente (Bernal, Nozal, Jiménez, 1997).

O **pH** durante a extracção de pesticidas no mel é também um parâmetro importante porque alguns pesticidas, como o amitraz, degradam-se a pH baixo (Corta, Bakkali, Berrueta, Gallo, Vicente, 1999) enquanto outros, como o cumafos, se degradam a pH alto (Corta *et al.*, 2000).

A **matriz** mel pode afectar a extracção eficiente de pesticidas, bem como a detecção aumentando ou diminuindo a resposta. Para contornar este problema devem ser efectuadas ensaios de extracção e de recuperação e análise quantitativa em amostras em branco fortificadas a diferentes níveis (Kujawski & Namiésnik, 2008).

A **metodologia de extracção** é um passo crucial na preparação da amostra assim como o passo de purificação (*clean-up*), que permite a eliminação dos componentes interferentes. A extracção de pesticidas é baseada nas suas propriedades físico-químicas nomeadamente polaridade, afinidade para os solventes, solubilidade, peso molecular e volatilidade (Kujawski & Namiésnik, 2008). A extracção de pesticidas no mel é geralmente feita por um dos procedimentos: extracção com solventes ou extracção líquido-líquido (SE - *solvent extraction*), extracção com fluido super crítico (SFE - *super critical fluid extraction*), extracção de fase sólida (SPE - *solid-phase-extraction*), dispersão de matriz em fase sólida (MSPD - *matrix solid-phase dispersion*), microextracção em fase sólida (SPME - *solid-phase microextraction*), extracção sortiva em barra magnética (SBSE - *stir bar sorptive extraction*) (Rial-Otero *et al.*, 2007; Ridgway, Lalljie, Smith, 2007; Preste, Friggi, Adaime, Zanella, 2009). Qualquer destes procedimentos tem as suas vantagens e inconvenientes. A procura de um método multirresíduos para pesticidas continua, pretendendo os investigadores que ele apresente as seguintes características: incluir o maior número de pesticidas possível, recuperações próximas dos 100%, capacidade de remoção dos compostos interferentes da amostra, boa precisão e robustez, baixo custo, rapidez, facilidade de execução e segurança

com a utilização de pequenos volumes de solventes e de baixa toxicidade (Preste *et al.*, 2009).

Os primeiros métodos multiresíduos datam de 1960 e foram desenvolvidos por Mill's *et al.* e utilizados na determinação de compostos orgânicos não polares em amostras não gordurosas usado basicamente na determinação de compostos organoclorados. Entretanto, com o desenvolvimento e uso de pesticidas com características mais polares, como os organofosforados e os organonitrogenados, surge a necessidade de outros métodos extracção que englobasse estes pesticidas. Surge, então, o método desenvolvido por Luke *et al.* em 1975, aperfeiçoado por Krigsman *et al.* em 1976 e o mini Luke desenvolvido por um laboratório holandês. Na década de 90, as pressões ambientalistas e relacionadas com a saúde humana, conduzem ao desenvolvimento de outros métodos usando menores quantidades de solventes nas etapas de extracção. Apesar dos avanços, o investimento em instrumentação continuava a ser exigido, bem como analistas treinados, tempo de análise e o número de pesticidas que podiam ser extraídos era reduzido. Em 2003 é então proposto um método de preparação de amostras para determinação multiresíduos em alimentos (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, Schenck, 2003) o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) (Preste *et al.*, 2009).

Em relação ao **método cromatográfico** a escolha poderá ser a Cromatografia Gasosa – CG (GC - *Gas Chromatography*) se o composto é termicamente estável ou a Cromatografia Líquida – CL (LC - *Liquid Chromatography*) se o composto é termicamente instável ou com baixa volatilidade (Scott, 2003).

Em relação ao mel, o método QuEChERS foi usado para extracção do cloranfenicol e quantificação por LC-MS, com recuperações entre 78-93% e RSD entre 3,7%-3,9% (Pan, Zhang, Chen, Xu, Jiang, 2006). Foi também usado por Barakat (2007) na extracção de 36 pesticidas em amostras de mel e determinação por GC-ECD (*Gas Chromatography-Electron Capture Detection*) e GC-NPD (*Gas Chromatography-Nitrogen Phosphorus detection*), com percentuais de recuperação entre 70 e 120% e RSD menor ou igual a 22% (Preste *et al.*, 2009).

A necessidade de pesquisar a presença de contaminantes conduziu à pesquisa do método mais adequado à especificidade da matriz, dado que sob o ponto de vista de amostra analítica, se trata de uma matriz muito complexa (Rissato *et al.*, 2007; Kujawski & Namiésnik, 2008). É uma substância altamente higroscópica e muito concentrada em açúcares, predominando a glucose e a frutose, contendo ainda proteínas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais e pólen. De entre os métodos pesquisados, a escolha recaiu na Cromatografia de Camada Fina (CCF) ou *Thin-Layer Chromatography* (TLC). Trata-se de um método largamente utilizado noutras matrizes com o mesmo objectivo e que

nos pareceu ser o mais adequado para uma avaliação relativamente rápida e económica, sobre a presença de contaminantes pesticidas.

A cromatografia é um método físico-químico de separação. Foi desenvolvida e usada pelo botânico Tswett em 1903 para separar pigmentos de plantas, daí o termo cromatografia. O termo é usado para qualquer técnica de separação que empregue o requisito essencial da separação cromatográfica, a existência de uma fase móvel e de uma fase estacionária. Apesar de, em 1930, Martin e Synge terem introduzido a cromatografia líquido-líquido, só em 1960 houve um grande desenvolvimento de todos os aspectos da cromatografia (Fried & Sherma, 1999).

A cromatografia tem por base a migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interacções entre duas fases não miscíveis, a fase móvel (que pode ser líquida ou gás) e a fase estacionária (sólida ou líquida), permitindo a separação, identificação e quantificação de cada um dos componentes presentes numa mistura. Os componentes retidos preferencialmente pela fase estacionária permanecem mais tempo no sistema do que aqueles que são distribuídos selectivamente pela fase móvel, ocorrendo então a separação (Scott, 2003).

Na Cromatografia de Camada Fina (CCF) ou *Thin-Layer Chromatography* (TLC), a fase estacionária é um sólido (sílica, alumina, celulose), depositado em camada fina e uniforme sobre um suporte sólido inerte (alumínio ou vidro). A fase móvel é um líquido de baixa viscosidade que por capilaridade elui através da fase estacionária.

A cromatografia de camada fina é uma técnica de detecção indicada para procedimentos de *screening* rápidos. A CCF pode detectar/identificar substâncias ou grupos de substâncias por visualização em ultra violeta e por aplicação de reagentes de visualização sobre a placa. Estes reagentes de visualização, a partir de uma reacção química tornam as substâncias cromóforas, e a cor é dependente dos grupos funcionais.

É uma técnica de separação simples, pouco dispendiosa e pode ser aplicada a um grande número de compostos existentes em matrizes complexas. A principal desvantagem é ser uma técnica qualitativa/semiquantitativa – colocação de amostras em quantidades conhecidas e quantificação por comparação (Touchstone, 1992).

Para se extrair os resíduos de pesticidas da amostra mel, para posterior detecção/identificação por cromatografia de camada fina, foi utilizada a técnica de extracção líquido-líquido, que se baseia na solubilidade de um composto em duas fases não miscíveis, envolvendo o uso de solventes para remover um composto de uma mistura líquida. As duas fases, fase aquosa e fase orgânica, não são miscíveis e o composto isolado é extraído da fase orgânica. Para assegurar a completa extracção do composto, podem ser necessárias extracções repetidas (Ridgway *et al.*, 2007).

A optimização desta técnica teve como objectivo extrair organofosforados, organoclorados, carbamatos e formamidina do mel previamente fortificado, de modo a que fosse apenas necessária uma metodologia de extracção. Não foi possível utilizar só uma metodologia de extracção porque o amitraz é instável e a sua degradação ocorre em toda a gama de pH, sendo mais rápida a pH ácido. Uma vez que o mel tem um pH que varia entre 3,5-4,5 e sob estas condições pode ocorrer a produção de metabolitos (a este pH principalmente 2,4-dimetilformamida, 2,4-dimetilformamidina, mas também 2,4-dimetilanilina) a extracção deste composto não pôde ser realizada pelo mesmo procedimento, uma vez que a extracção do amitraz estava dependente do pH (Corta *et al.*, 1999). Por outro lado a degradação de cumafos ocorre a pH básico e é reversível por acidificação (Corta *et al.*, 2000). Pelos motivos apontados, desenvolveram-se dois procedimentos de extracção, um para o lindano, cumafos e metiocarbe e outro para o amitraz.

#### 1.7.3.2. Avaliação microbiológica do mel

A legislação Portuguesa (Decreto-Lei nº 214/3003), Europeia (Directiva 2001/110/CE) e Internacional (Codex Stan 12 – 1981) não exigem a realização de análises microbiológicas em mel. Recomendam que devem ser seguidas práticas de higiene na manipulação de alimentos e implementação de Boas Práticas de Fabrico.

De um modo geral, as especificações para o estudo de microrganismos no mel são as referidas para outros alimentos e ingredientes. As análises correntemente utilizadas são contagem de microrganismos aeróbios totais, contagem de coliformes ou de *Enterobacteriaceae*, contagem de bolores e leveduras e pesquisa de algumas bactérias patogénicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e espécies de *Clostridium* (Snowdon & Cliver, 1996).

A contagem de microrganismos totais, fornece informação geral e é um indicador da qualidade microbiológica do mel, podendo ser necessários testes para identificar o tipo de microrganismos presentes se as contagens forem muito elevadas. Mel com contagens de 10000 ufc/g, se outros critérios microbiológicos estiverem satisfeitos (teor de presença de leveduras e livres de contaminação fecal), pode ser aceitável (Snowdon & Cliver, 1996).

Bolores e leveduras são regularmente encontrados no mel e os teores podem ser controlados por Boas Práticas de Fabrico. A contagem de bolores e leveduras dá indicações da qualidade e condição do mel, indicação sobre a vida útil do produto e potencial de degradação (probabilidade de ocorrer fermentação) (Snowdon & Cliver, 1996).

O teor de enterobactérias é um indicador das práticas sanitárias de higiene. Nesta categoria incluem-se todas as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas Gram-negativas, não formadoras de esporos, fermentadoras da lactose. Predominam bactérias pertencentes aos

géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*. As contaminações fecais não têm sido relatadas em mel e o crescimento de organismos associados também não. A contagem de coliformes pode ser usada como um indicador geral de contaminação fecal, bem como de higienização (Snowdon & Cliver, 1996).

A contagem de *Escherichia coli*, é considerada um indicador específico de contaminação fecal, contudo contaminações fecais não estão associadas ao mel, pelo que a sua avaliação pode ser dispensável (Snowdon & Cliver, 1996).

O agente patogénico *Salmonella*, pode sobreviver no mel mas não se multiplica pelo que não há relatos da sua presença no mel. A sua pesquisa pode ser aplicada quando não é utilizado nenhum tratamento térmico no mel, como indicador geral é desnecessário (Snowdon & Cliver, 1996).

O *Staphylococcus aureus* é incapaz de se reproduzir em mel pelo que a sua toxina não é encontrada neste alimento. Este perigo pode ser introduzido no mel pela manipulação, sendo controlado por Boas Práticas de Fabrico. Nenhuma forma vegetativa de espécies bacterianas patogénicas foi encontrada no mel. A pesquisa deste agente ou a da sua toxina não é indicada (Snowdon & Cliver, 1996).

Os Esporos de *Bacillus* e *Clostridium*, são geralmente encontrados no mel. Os teores de *Bacillus* são normalmente inferiores a 200 ufc/g, mas níveis mais elevados podem estar presentes (milhares por grama). Os esporos de *C. botulinum* são geralmente encontrados a níveis inferiores a 1 ufc/g, podendo contudo ser encontrados teores de 60 ufc/g (Snowdon & Cliver, 1996).

Resumindo sugere-se que os teste microbiológicos efectuados a méis deveriam englobar: contagens de aeróbios totais, bolores e leveduras, coliformes e bactérias formadoras de esporos. Se um determinado microrganismo se tornar um problema deverá ser investigado (Snowdon & Cliver, 1996).

## **Capítulo II: Implementação da metodologia de extracção e detecção de pesticidas no mel por cromatografia de camada fina**

### **2.1. Objectivos**

Um dos objectivos do presente trabalho foi o desenvolvimento de um método de extracção de pesticidas no mel possível de utilizar como método de rastreio, recorrendo à Cromatografia de Camada Fina para detecção.

Foi assim desenvolvida a extracção de lindano, cumafos, metiocarbe sulfóxido e amitraz de amostras de mel fortificadas e a sua detecção por Cromatografia de Camada Fina (CCF).

### **2.2. Materiais e métodos**

#### **2.2.1. Reagentes e soluções**

Os reagentes e soluções utilizados para a extracção e para a CCF (todos de grau elevado de pureza), bem como a sua proveniência são indicados como se segue.

O diclorometano (ref. D/1852/17) foi fornecido pela Fisher Scientific UK. O cloreto de zinco (ref. 8816), peróxido de hidrogénio a 30% (ref. 1.08597) e amónia (ref.5428) foram fornecidos pela Merck. A difenilamina (ref. D-3409), ácido clorídrico a 37% (ref.30721) e 2-Fenoxietanol (ref. P-1126) utilizados foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, Alemanha. A acetona (ref. 400974) foi adquirida à Carlo Erba. O metanol (ref. 131091), n-hexano (ref. 133242), sulfato de sódio anidro (ref. 131716), ácido sulfúrico (ref. 131058), ácido perclórico (ref. 132175) e clorofórmio (ref. 131252) utilizados foram fornecidos pela Panrec Química, Espanha. O acetronitrilo (ref. AO2C11X) foi fornecido pela Lab Scan. O dicloreto de paládio (ref. A0862) foi fornecido pela Applichem e o nitrato de prata pelo Laboratório Mundial.

#### **2.2.2. Padrões de pesticidas**

Os padrões de pesticidas utilizados foram cumafos (Fluka, ref. 4503), lindano (Fluka, ref. 45548), metiocarbe sulfóxido (Fluka, ref. 34177) e amitraz (Fluka, ref.45323).

### 2.2.3. Determinação do factor de retenção (RF) e do limite de detecção (LD) para cada um dos pesticidas

#### 2.2.3.1. Preparação das soluções padrão

Foram preparadas soluções padrão de cada pesticida com uma concentração de 1000 µg/ml. Para tal pesaram-se 10 mg de cada pesticida (Balança digital, Precisa 125 A, Max = 100 g, 0,0001) aos quais se adicionou acetona, até perfazer 10 ml.

As soluções padrão foram armazenadas ao abrigo da luz e a uma temperatura de 4 °C, com o objectivo de as preservar da degradação (Bernal *et al.*, 1997).

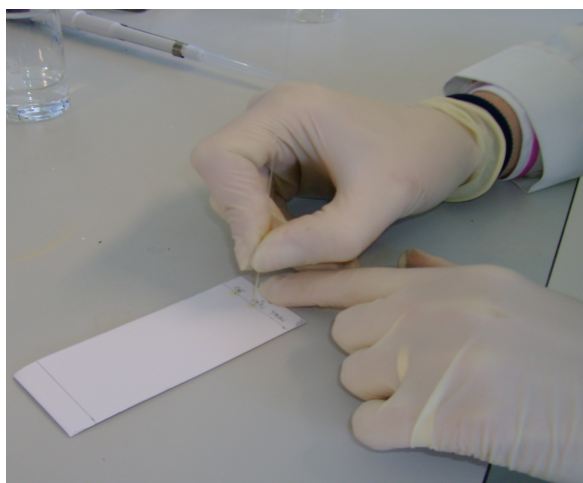
Sempre que necessário foram realizadas diluições das soluções padrão.

#### 2.2.3.2. Procedimento de cromatografia de camada fina

Foram utilizadas placas cromatográficas de alumínio cobertas com sílica gel G, 60 F<sub>254</sub> (ref. 1.05554, Merck, Alemanha). Fez-se um traço a 1 cm da base. Sobre esse traço e com o auxílio de um pequeno capilar (Figura 16), foram aplicados 10 µl (Fried & Sherma, 1999) de cada uma das soluções de trabalho, preparadas a partir das soluções padrão por diluição, equivalente a 0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 5 µg.

Foi feita uma placa para cada um dos pesticidas em três dias seguidos.

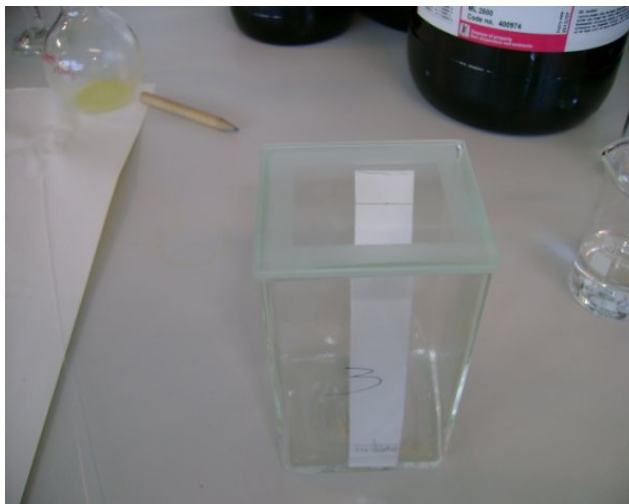
**Figura 16 – Preparação das placas de cromatografia**



### 2.2.3.3. Eluição na câmara de cromatografia

As placas foram a eluir numa tina de cromatografia (Figura 17) onde previamente se colocaram os eluentes para saturação da câmara (Fried & Sherma, 1999).

**Figura 17 – Tina de cromatografia**



Para o Metiocarbe os eluentes utilizados foram a acetona e o clorofórmio na proporção de 8:2 (v/v). Para o Cumafos, Lindano e Amitraz os eluentes utilizados foram o n-hexano e a acetona na proporção de 8:2 (v/v).

Após a eluição de cada placa (em tina vertical de vidro, utilizando-se desenvolvimento unidimensional ascendente, à temperatura ambiente), correspondente a cada pesticida e a cada diferente concentração, estas foram secas à temperatura ambiente e posteriormente visualizadas sob luz UV na câmara de visualização (Camag UV-Cabine II) a 254 nm e a 366 nm (Sherma, 2003).

De modo a poder identificar ou confirmar a presença de cada pesticida as placas foram aspergidas com reagentes de revelação.

### 2.2.3.4. Preparação dos reagentes de revelação

A preparação dos reagentes de revelação foi efectuada de acordo com Rodrigues *et al.* (2005).

**Cumafos (organofosforado).** A 0,5 g de dicloreto de paládio (Sherma, 2003) adicionou-se 50 ml de água destilada, 10 ml de ácido clorídrico 1 N e completou-se ao volume de 100 ml com água destilada.

**Lindano (organoclorado).** A 0,1 g de nitrato de prata adicionou-se 0,5 ml de água destilada, 30 ml de 2-fenoxietanol e 2 a 3 gotas de água oxigenada a 30%. Completou-se até ao volume de 200 ml com acetona.

**Metiocarbe sulfóxido (carbamato).** Juntaram-se 0,5 g de cloreto de zinco e 0,25 g de difenilamina e completou-se o volume até 50 ml com acetona.

**Amitraz (formamidina).** A 95 ml de uma solução de niidrina a 0,2% em n-butanol adicionou-se 5 ml de ácido acético a 10% (Fried & Sherma, 1999).

#### 2.2.3.5. Visualização da cor das manchas desenvolvidas para cada pesticida

Depois de pulverizadas as placas de Cumafos, Metiocarbe e Amitraz foram colocadas na estufa (Melag) a 110 °C durante 15 minutos. A placa de Lindano foi exposta à luz ultravioleta durante 10 a 15 minutos. Observou-se a cor das manchas desenvolvidas.

#### 2.2.3.6. Cálculo do factor de retenção (Rf) para cada pesticida

Na cromatografia de camada fina, o Rf é função da fase fixa utilizada e do eluente (fase móvel). Por definição é a razão entre a distância percorrida pela mancha do composto e a distância percorrida pelo eluente,  $R_f = d_c/d_e$  (Fried & Sherma, 1999).

Os valores de Rf foram determinados, após visualização da placa sob luz UV a 254/ 366 nm e depois de terem sido aspergidas com os reagentes de revelação.

Para obtenção dos valores de Rf para cada pesticida todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado em triplicado e em dias diferentes.

Calculou-se a média aritmética, o desvio padrão associado e o coeficiente de variação através da folha de cálculo Excel.

#### 2.2.3.7. Determinação dos limites de detecção para cada pesticida

Para se conhecer qual a concentração mínima de cada pesticida detectada pela técnica de cromatografia de camada fina, foram feitas eluições de soluções, de diferentes concentrações, de cada pesticida (0,3 a 5 µg). A visualização das manchas foi feita por observação sob luz UV a 254/366 nm e por aplicação de reagentes de pulverização.

Para obtenção dos limites de detecção para cada pesticida todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado em triplicado e em dias diferentes.

## 2.2.4. Procedimentos de extracção e detecção em amostras fortificadas

### 2.2.4.1. Procedimento de Extracção para Lindano (OC), Cumafos (OF), Metiocarbe (C)

Após a pesagem, amostras de 50 g de mel foram fortificadas com diferentes concentrações de pesticidas (0,4 µg/g, 0,5 µg/g, 1 µg/g, 2 µg/g).

Uma amostra não fortificada foi usada como branco.

As amostras fortificadas foram homogeneizadas e ficaram à temperatura ambiente aproximadamente 30 minutos para que o solvente (acetona) se evaporasse antes do procedimento de extracção.

Após a evaporação da acetona adicionaram-se 50 ml de uma mistura de metanol e água (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA), na proporção 70:30, v/v (Herrera *et al.*, 2005), com o objectivo de melhorar a homogeneização da amostra que decorreu de seguida com agitador magnético, a 100 rpm, durante 30 minutos. Usou-se esta rotação mais baixa e prolongou-se o tempo de agitação a fim de evitar a formação de emulsão (Kujawski & Namiésnik, 2008).

Após completa dissolução do mel na mistura metanol:água adicionaram-se 60 ml de diclorometano e homogeneizou-se durante 30 minutos.

Após o período de homogeneização adicionaram-se 60 ml de n-hexano e transferiu-se para uma ampola de decantação. Recolheu-se a fase superior e à fase inferior adicionou-se 30 ml de n-hexano e repetiu-se (Rezic, Horvart, Babié, Kastelan-Macan, 2005). Juntaram-se as fases inferiores e adicionou-se 1 g de sulfato de sódio anidro, para eliminar a água.

O extracto foi evaporado até à secura, num evaporador rotativo (Heidolph VV 2000), em banho-maria a 30 °C.

### 2.2.4.2. Procedimento de Extracção para Amitraz (Formamidina)

Após a pesagem, amostras de 20 g foram fortificadas com diferentes concentrações de amitraz (0,4 µg/g, 0,5 µg/g, 1 µg/g, 2 µg/g).

Uma amostra não fortificada foi usada como branco.

As amostras fortificadas foram homogeneizadas e ficaram à temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, para que o solvente (acetona) se evaporasse antes do procedimento de extracção.

Após a evaporação da acetona adicionou-se 1 ml de água destilada para facilitar a homogeneização da amostra.

De seguida acertou-se a pH 11,5 (Jimenez, Nozal, Bernal, Santos, Mayorga, 2002) medido com papel indicador, 50 ml de uma solução de n-hexano e acetona, na proporção 80:20, (v/v), com amónia 0,28% (Martel & Zeggane, 2002). Homogeneizou-se a mistura durante 20 minutos a 100 rpm. Repetiu-se este passo duas vezes (Rezic *et al.*, 2005).

Transferiu-se para uma ampola de decantação e recolheu-se a fase superior à qual se adicionou 1 g de sulfato de sódio anidro, para eliminar a água. O extracto foi evaporado até à secura, num evaporador rotativo (Heidolph VV 2000), à temperatura ambiente.

#### 2.2.4.3. Detecção dos resíduos de pesticidas nas amostras de mel fortificadas por cromatografia de camada fina

Após obtenção do resíduo seco por evaporação, este foi resuspenso em 1 ml de acetona. As placas de cromatografia foram preparadas, colocando-se em pontos distintos: solução padrão, extracto ressuspendido do mel não fortificado (amostra em branco), extracto ressuspendido do mel fortificado com cada um dos níveis (0,4 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 2 µg/kg).

Foi feita a eluição das placas em tina vertical de vidro, utilizando-se desenvolvimento unidimensional ascendente.

Após a secagem das placas à temperatura ambiente, estas foram visualizadas sob luz UV a 254 nm e a 366 nm e aspergidas com o reagente específico.

As placas com os pesticidas Cumafos, Metiocarbe e Amitraz foram colocadas na estufa a 110 °C durante 15 minutos e a placa com o pesticida Lindano foi exposta à luz ultravioleta durante 10 a 15 minutos. Foi então observado e anotado o desenvolvimento da cor das manchas.

## 2.3. Resultados e discussão

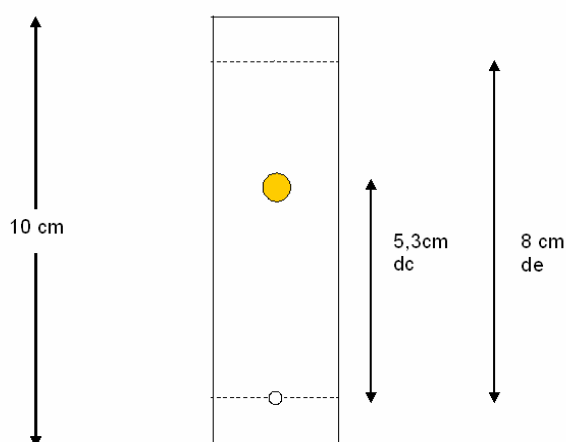
### 2.3.1. Determinação do factor de retenção ( $R_f$ ) de Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz em cromatografia de camada fina.

Mantendo as condições de cromatografia (fase móvel utilizada, fase fixa utilizada, quantidade relativa de material, câmara de cromatografia), o valor de  $R_f$  mantém-se constante para um determinado composto. É um valor guia pois podem existir compostos com o mesmo  $R_f$ , mas o padrão pipetado ao lado da amostra (matriz mel) serve como termo de comparação, sendo então importante determinar o  $R_f$  de cada um dos padrões para futura comparação.

Após secagem, visualização das placas com luz UV e pulverização com os reagentes de visualização, as manchas observadas foram assinaladas e o  $R_f$  calculado (Fried & Sherma, 1999).

Como foi referido anteriormente, o  $R_f$  é a razão entre a distância percorrida pela mancha do composto e a distância percorrida pelo eluente, de acordo com a Figura 18.

**Figura 18 – Esquema de placa de cromatografia, cálculo do Rf**



Os cálculos foram realizados de acordo com a seguinte expressão:  $R_f = d_c/d_e$

Sendo:

dc- a distância ao centro da mancha;

de- a distância percorrida pelo eluente.

O  $R_f$  foi calculado para cada uma das placas (com as diferentes concentrações) e as médias calculadas intra placa e entre placas.

Os valores médios de  $R_f$  obtidos para o Cumafos, Lindano, Metiocarbe e Amitraz foram respectivamente:  $0,25 \pm 0,01463$ ;  $0,48 \pm 0,01969$ ;  $0,72 \pm 0,01010$  e  $0,63 \pm 0,01127$  de acordo com a Tabela 9.

A variação entre placas é superior à variação intra placas, excepto para o amitraz onde se verificou uma grande variação intra placa.

**Tabela 9 – Estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) dos valores obtidos para os factores de retenção (Rf) dos diferentes padrões de pesticidas (Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz) no mesmo dia e em diferentes dias**

Padrão	Placa 1			Placa 2			Placa 3			Entre Placas		
	Rf <sup>a</sup>	DP	CV %	Rf <sup>a</sup>	DP	CV %	Rf <sup>a</sup>	DP	CV %	Rf <sup>b</sup>	DP	CV %
<b>Cumafos</b>	0,27	0,00722	2,7%	0,24	0,00000	0,0%	0,25	0,00000	0,0%	0,25	0,01463	5,8%
<b>Lindano</b>	0,47	0,00722	1,5%	0,50	0,01250	2,5%	0,46	0,00000	0,0%	0,48	0,01969	4,1%
<b>Metiocarbe sulfóxido</b>	0,73	0,00884	1,2%	0,71	0,01118	1,6%	0,73	0,00884	1,2%	0,72	0,01010	1,4%
<b>Amitraz</b>	0,63	0,01896	3,0%	0,64	0,02710	4,2%	0,62	0,00685	1,1%	0,63	0,01127	1,8%

(n=3)

a) Média dos valores de uma placa

b) Média dos valores de Rfs obtidos em placas diferentes em dias diferentes

### 2.3.2. Determinação do limite de detecção (LD) para Cumafos, Lindano, Metiocarbe sulfóxido e Amitraz em cromatografia de camada fina

Importava saber qual a concentração mínima de cada pesticida que seria detectada pela técnica de cromatografia de camada fina e nas condições de laboratório. As eluições de soluções, de diferentes concentrações, de cada pesticida (0,3 a 5 µg) foram visualizadas sob luz UV a 254/366 nm e as manchas observadas após a aplicação de reagentes de revelação.

Para obtenção dos limites de detecção para cada pesticida todo o procedimento descrito anteriormente foi realizado em triplicado e em dias diferentes. Os resultados estão indicados na Tabela 10.

**Tabela 10 – Quantidade mínima detectada (Limite de detecção – LD) de cada pesticida padrão**

Pesticida	Observação UV		Revelação Cor da mancha	Quantidade µg					
	254nm	366nm		0,3	0,4	0,5	1	2	5
<b>Cumafos</b>	Visível	-	Amarelo Fundo bege	ND	ND	ND	S	S	S
<b>Lindano</b>	-	Visível	Castanho Fundo castanho claro	ND	ND	ND	S	S	S
<b>Metiocarbe Sulfóxido</b>	Visível	-	Branca Fundo azul claro	ND	S	S	S	S	S
<b>Amitraz</b>	Visível	-	Violeta Fundo branco	ND	S	S	S	S	S

Foram consideradas credíveis as placas cujas manchas foram detectadas à luz UV 254/366 nm e se revelaram claramente visíveis após pulverização com o reagente de revelação. A quantidade mínima detectada foi de 0,4 µg para o metiocarbe sulfóxido e amitraz e de 1 µg para o cumafos e lindano. A cor das manchas observadas foi de amarelo com fundo bege para o cumafos, castanho com fundo castanho claro para o lindano, branca com fundo azul claro para o metiocarbe sulfóxido e violeta com fundo branco para o amitraz.

### 2.3.3. Resultados da extracção de pesticidas em amostras fortificadas em cromatografia de camada fina

Os resultados foram obtidos através da comparação dos Rfs da solução padrão e amostras fortificadas, cor das manchas obtidas após pulverização com os reagentes de revelação e visualização das manchas à luz UV a 254 nm/366 nm. Para todos estes aspectos teria de haver correspondência entre manchas da solução padrão e manchas das amostras fortificadas (Sherma, 2003).

Foram consideradas credíveis as placas cujas manchas foram detectadas à luz UV 254/366 nm, se revelaram claramente visíveis após pulverização com o reagente de revelação e com a cor referida na Tabela 10 e o Rf da amostra fortificada correspondia ao Rf do padrão (Tabela 9). Esta situação verificou-se em todos os pesticidas na quantidade de 1 µg/g, ou seja o mel tem que estar contaminado com um nível superior a 1000 µg/kg para ser detectado com o procedimento de extracção desenvolvido, usando Cromatografia de Camada Fina e nas nossas condições de laboratório. Os resultados estão indicados na Tabela 11.

**Tabela 11 – Resultados da extracção de pesticidas em amostras fortificadas em Cromatografia de Camada Fina**

Pesticida	Observação UV		Revelação Cor da mancha	Nível de fortificação µg/g			
	254nm	366nm		0,4	0,5	1	2
<b>Cumafos</b>	Visível	-	Amarelo Fundo bege	ND	ND	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Lindano</b>	Não Visível	Visível	Castanho Fundo castanho claro	ND	ND	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Metiocarbe sulfóxido</b>	Visível	-	Branca Fundo azul claro	ND	ND	<b>S</b>	<b>S</b>
<b>Amitraz</b>	Visível	-	Violeta Fundo branco	ND	ND	<b>S</b>	<b>S</b>

## **Capítulo III: Caracterização da oferta de mel e conformidade de rotulagem**

### **3.1. Objectivos**

Este capítulo tem como objectivos caracterizar a oferta de mel, enunciando que tipo de mel está à disposição do consumidor no mercado da região de Lisboa, e analisar a rotulagem das embalagens de mel, com a finalidade de observar se a informação fornecida ao consumidor cumpre os requisitos legais.

### **3.2. Materiais e métodos**

Foram visitados 10 estabelecimentos comerciais de diferentes naturezas para a caracterização da oferta de mel, através do registo em folha de questionário (Anexo 2) dos tipos de mel presentes, com registo da informação apresentada no rótulo do produto.

Os dados foram introduzidos numa folha de cálculo Excel e analisados utilizando métodos estatísticos descritivos.

### **3.3. Resultados**

Foram visitados 3 hipermercados, que apresentaram a maior diversidade de méis, 4 supermercados, 1 mercearia de bairro, 1 frutaria, 1 pastelaria.

A oferta de tipos de mel por estabelecimento variou entre 1 (na mercearia de bairro, frutaria, e pastelaria) e 38 (Continente do Colombo).

As secções onde normalmente se podem encontrar os méis são mercearia, *gourmet* e dietética, sendo que todos os produtos se encontravam resguardados da exposição directa a raios solares, em todos os estabelecimentos.

Os requisitos da rotulagem do mel foram revistos, no ponto 1.5. Informação ao consumidor – rótulo, o que deve constar, do Capítulo I, estando legislados pelos Decreto-lei nº 560/1999 e Decreto-Lei nº 214/2003. Os aspectos exigidos na informação ao consumidor foram analisados em 105 registos, em relação à oferta de mel encontrada nos estabelecimentos visitados. Os resultados desta avaliação estão expressos na Tabela 12.

**Tabela 12 – Avaliação da rotulagem da oferta de méis em 10 estabelecimentos de Lisboa**

	<b>Presente % de embalagens</b>	<b>Não presente % de embalagens</b>
<b>Idioma em português</b>	99	1
<b>Denominação de venda</b>	100	0
<b>Origem: designação do país de origem ou designação CE e não CE</b>	90	10
<b>Quantidade líquida (kg ou g)</b>	97	3
<b>Data de durabilidade mínima</b>	100	0
<b>Nome, firma ou denominação social de produtor/embalador/vendedor estabelecido na UE</b>	100	0
<b>Morada</b>	89	11
<b>Lote</b>	90	10
<b>*Condições de conservação</b>	30	70
<b>*Informação ao consumidor</b>	28	72
<b>*Origem floral</b>	57	43

\* Itens não obrigatórios na rotulagem

Todos os produtos apresentavam denominação de venda, data de durabilidade mínima e indicação sobre nome, firma ou denominação social de produtor/embalador/vendedor estabelecido na União Europeia.

Apenas uma das embalagens de mel encontradas não apresentava a informação ao consumidor em Português; os outros idiomas utilizados foram o Inglês (7%) e o Espanhol (16%).

Em relação ao País de origem do mel, 10% das embalagens não apresentavam essa informação.

A percentagem de não conformidades relativamente à quantidade líquida foi de 3%.

A morada do fabricante ou do embalador ou de um vendedor estabelecido na União Europeia não está indicada em 11% das embalagens.

A identificação do lote não está presente em 10% das embalagens.

Não sendo obrigatória a informação sobre as condições de conservação, uma vez que estas são à temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar, 70% das embalagens não apresentavam esta informação. Das que apresentavam (30%), as indicações conservar em local fresco e seco e à temperatura ambiente eram as mais frequentes. Conservação ao abrigo da luz só se encontrava numa embalagem, bem como conservar a embalagem em

local livre de odores e o mesmo a conservar a embalagem bem fechada. Uma embalagem indicava o frigorífico como sendo o local ideal para conservar o mel.

Em relação a outras informações ao consumidor (informação não obrigatória), 28% das embalagens traziam-na. Alegações como anti-reumático, diurético, tonificante e regenerador constavam em 2 embalagens. Informação nutricional estava presente em 5 embalagens. Linha do consumidor indicada em 8 embalagens. Outras informações indicavam: que o produto podia cristalizar e para reverter a situação bastava colocar em banho maria (12 embalagens); que o produto não era aconselhável a crianças com menos de 1 ano (10 embalagens). Uma embalagem indicava que após a abertura devia conservar-se no frio e consumir em 21 dias.

Em relação à origem floral (informação não obrigatória) a informação está ausente em 43% das embalagens. A origem floral apurada predomina o rosmaninho (38%), rosmaninho e outros (7%), urze (15%), eucalipto (10%), seguido de laranjeira, queiró, multiflores, acácia, alecrim, alfazema em 8%, 7%, 5%, 5%, 3% e 2% das embalagens, respectivamente.

Em resumo, das 105 embalagens estudadas, 28 (27%) apresentaram-se como não conformes em alguns dos itens considerados. As não conformidades são respeitantes ao lote (11), idioma (1), morada (2), origem (1), origem e morada (10) e quantidade líquida (3).

## **Capítulo IV: Contaminantes químicos e microbiológicos em mel adquirido no mercado de Lisboa**

### **4.1. Objectivos**

É objectivo deste capítulo a pesquisa de contaminantes químicos (lindano, cumafos, metiocarbe sulfóxido e amitraz), por Cromatografia de Camada Fina utilizando o método de extracção desenvolvido, e de contaminantes microbiológicos (presença de *Salmonella* e de esporos de clostrídeos sulfito-redutores e a contagem de bolores e leveduras) em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa.

### **4.2. Materiais e métodos**

#### **4.2.1. Origem das amostras**

Foram adquiridas 23 amostras de mel de diferentes marcas em estabelecimentos comerciais da região da grande Lisboa, numa amostragem de conveniência em que se tentou representar a diversidade de marcas e tipos de mel à disposição dos consumidores. Esta recolha foi realizada entre Março e Outubro de 2009, em hipermercados, supermercados, mercearias, pastelarias, frutarias e mercados locais onde se encontra mel em comercialização.

Foram armazenadas ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, até ao momento de utilização (Kujawski & Namiésnik, 2008).

#### **4.2.2. Procedimentos de extracção e detecção de pesticidas em amostras de mel adquirido no mercado da região de Lisboa**

##### **4.2.2.1. Extracção de pesticidas em amostras de mel adquirido no mercado de Lisboa**

As amostras foram submetidas a um processo de extracção líquido-líquido usando os procedimentos idênticos aos descritos anteriormente.

4.2.2.2. Detecção de pesticidas nas amostras de mel adquirido no mercado da região de Lisboa por cromatografia de camada fina.

Após obtenção do resíduo seco por evaporação, este foi ressuspenso em 1 ml de acetona. As placas de cromatografia foram preparadas, colocando em 3 pontos distintos: extracto; solução padrão de pesticida (1 mg/ml); extracto e solução padrão de pesticida (1 mg/ml).

Foi feita a eluição das placas em tina vertical de vidro, utilizando desenvolvimento unidimensional ascendente (de acordo com o ponto 2.2.3.3).

Após a secagem das placas à temperatura ambiente, estas foram visualizadas sob luz UV a 254 nm e a 366 nm e aspergidas com o reagente específico (ponto 2.2.3.4.).

As placas com os pesticidas Cumafos, Metiocarbe e Amitraz foram colocadas na estufa a 110 °C durante 15 minutos e a placa com o pesticida Lindano foi exposta à luz ultravioleta durante 10 a 15 minutos. Foi então observado e anotado o desenvolvimento da cor das manchas.

#### **4.2.3. Análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa**

As determinações microbiológicas realizadas foram pesquisa de *Salmonella*, pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito redutores e contagem de bolores e leveduras.

##### **4.2.3.1. Pesquisa de *Salmonella***

Para a pesquisa de *Salmonella* utilizou-se a metodologia descrita na Norma Portuguesa NP – 1933 (1982), que se desenrola em quatro fases: pré-enriquecimento, enriquecimento selectivo, isolamento e identificação, confirmação.

O pré-enriquecimento foi efectuado a partir de uma suspensão inicial preparada com 225 ml de água peptonada tamponada à qual foi adicionado 25 g de mel, homogeneizada e incubada a 37 °C durante 24 horas.

Na fase de enriquecimento selectivo os meios utilizados foram MKTT (*Muller-Kauffman Tetrathionate medium base*) (Scharlau, Espanha) e RVS (*Rappaport Vassiliadis Broth*) (Scharlau, Espanha). A 10 ml do meio MKTT foi adicionado 1 ml da suspensão inicial pré-enriquecida seguindo-se a sua incubação a 37 °C durante 24 horas. A 10 ml do meio RVS foi adicionado 0,1 ml da mesma suspensão inicial seguindo-se a incubação a 42 °C durante 24 horas.

Para isolamento utilizaram-se os meios selectivos XLD (*Xylose Lysine Desoxycholate*) (Scharlau, Espanha) e Hektoen (*Hektoen Enteric Agar*) (Scharlau, Espanha) distribuídos em placas, nas quais a cultura proveniente da fase de enriquecimento foi semeada por estrias.

Os meios de cultura semeados foram a incubar a 37 °C durante 24 horas. Ao fim do tempo de incubação observaram-se a existência de colónias suspeitas. As colónias suspeitas no meio XLD apresentam-se de cor vermelha, transparentes ou com halo negro. No meio *Hektoen* as colónias apresentam-se de cor verde ou verde com centro negro.

Todas as colónias suspeitas devem ser sujeitas a confirmação. Assim, repicam-se as colónias suspeitas, para tubos de TSI (*Triple Sugar Iron Agar*) (Oxoid, Inglaterra) inclinado, por picada no fundo e estria na rampa e vão a incubar a 37 °C durante 24 horas. São positivos os tubos que mostrem fundo vermelho, bisel amarelo, produção ou não de gás e enegrecimento do meio.

O isolamento é feito em meio TSA (Tryptona soja agar) (Scharlau, Espanha) incubando a 37 °C durante 24 horas. A identificação e confirmação são feitas com provas bioquímicas.

Os resultados são expressos indicando a ausência ou presença de *Salmonella* em 25 g de mel.

#### 4.2.3.2. Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores

Para a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito redutores em 1 g de amostra, seguiu-se a metodologia da Norma Portuguesa NP – 2262 (1986). Utilizou-se a suspensão inicial preparada no ponto anterior (diluição  $10^{-1}$ ), retirando-se 10 ml correspondentes a 1 g de amostra. As formas vegetativas foram inactivadas colocando os tubos com 10 ml da suspensão inicial em banho-maria a 80 °C durante 10 minutos, findo o qual foram arrefecidos em água fria. Foi então incorporado o meio de cultura agar SPS (*Sulfit Polimixin Sulphadiazin Agar*) (Scharlau, Espanha) e os tubos foram arrefecidos para solidificar o meio. Os tubos foram a incubar a 44,5 °C durante 48 horas. Os tubos foram observados para a existência de colónias suspeitas, colónias negras características, em forma de “pompom”.

Os resultados são expressos indicando-se como positivos ou negativos em 1 g de mel.

#### 4.2.3.3. Contagem de bolores e leveduras

Para a contagem de bolores e leveduras seguiu-se a metodologia descrita na Norma Portuguesa NP – 3277-1 (1987). Foi utilizada a suspensão inicial preparada anteriormente e feitas diluições seriadas de acordo com a NP – 3277-1 (1987) até  $10^{-3}$ . Procedeu-se à sementeira em placa de *Rose Bengal Agar* (Scharlau, Espanha) à superfície e em quintuplicado de 0,2 ml de cada uma das diluições. As placas foram a incubar a 25 °C durante cinco dias, efectuou-se a observação das placas para contagem das colónias. Os resultados são expressos em unidades formadoras de colónias por grama.

### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1. Caracterização da amostra

As amostras de mel analisadas, num total de 23, provêm de méis de vários tipos e origens, todos embalados para consumo doméstico e foram adquiridas em vários estabelecimentos de comércio de alimentos da região de Lisboa.

Vinte e dois estavam embalados em recipientes de vidro e apenas um em recipiente plástico. As quantidades líquidas variaram entre 200 e 500 g, com preços entre os 38 cêntimos e os 1,17 Euros por 100 g, estando estas diferenças principalmente relacionadas com a embalagem do produto. A Tabela 13 apresenta o resultado da análise da rotulagem destas amostras de méis.

**Tabela 13 – Avaliação da rotulagem da amostra de 23 méis analisados**

	<b>Nº de amostras conforme</b>	<b>Nº de amostras não conforme</b>
<b>Idioma em português</b>	23	0
<b>Designação de venda</b>	23	0
<b>Origem: designação do país de origem ou designação CE e não CE</b>	22	1
<b>Quantidade líquida (kg ou g)</b>	23	0
<b>Data de durabilidade mínima</b>	23	0
<b>Nome, firma ou denominação social de produtor/embalador/vendedor estabelecido na UE</b>	23	0
<b>Morada</b>	21	2
<b>Lote</b>	22	1
<b>*Condições de conservação</b>	10	13
<b>*Origem floral</b>	15	8
<b>*Modo de produção ou apresentação</b>	2	21

\* Itens não obrigatórios na rotulagem

Todos os rótulos estavam em Português tendo 5 deles tradução em outras línguas (espanhol (2), inglês (3), francês (3) e alemão (1)). A designação de venda foi sempre “Mel” seguindo-se na maioria dos casos a origem floral ou a marca. Uma embalagem não apresentava designação de origem, 4 amostras era “CE e não CE” e 1 era da Argentina.

Todas as embalagens apresentavam a quantidade líquida e a data de durabilidade mínima que variou entre 2010 e 2012. Todas as embalagens tinham registo de produtor, embalador ou vendedor. Uma embalagem não apresentava identificação de lote e duas não indicavam a morada.

Relativamente à informação não obrigatória que pode constar da rotulagem do mel, cerca de metade não apresentava as condições de conservação, a maioria não referia o modo de produção ou apresentação, bem como a origem floral.

#### 4.3.2. Extração de pesticidas em mel adquirido no mercado da região de Lisboa

Usando os procedimentos descritos anteriormente (ponto 2.2.4.), as amostras foram submetidas a um processo de extração líquido-líquido. Os resultados estão indicados na Tabela 14.

**Tabela 14 – Resultados obtidos na pesquisa de cumafos, lindano, metiocarbe sulfóxido e amitraz por cromatografia de camada fina em mel adquirido na região de Lisboa**

Amostras	Pesticidas			
	Cumafos	Lindano	Metiocarbe sulfóxido	Amitraz
1	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
2	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
3	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
4	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
5	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
6	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
7	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
8	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
9	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
10	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
11	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
12	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
13	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
14	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
15	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
16	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inconclusivo	Inferior 1 µg/g
17	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
18	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
19	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
20	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
21	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
22	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
23	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g

Foram consideradas com pesticidas (cumafos, lindano, metiocarbe sulfóxido ou amitraz) num valor superior ao limite de detecção, 1 µg/g (ponto 2.3.3.), as amostras de mel cujas

manchas cumpriram o seguinte: foram detectadas à luz UV 254/366 nm ao mesmo nível do padrão, revelaram a cor referida na Tabela 10 e de acordo com o padrão, o Rf apresentado pela amostra de mel correspondia ao Rf do padrão (Tabela 9).

As amostras que cumpriram os requisitos referidos estão presentes na Tabela 15. Apresentaram-se como tendo pesticida superior ao limite de detecção de 1 µg/g usando a técnica de extracção líquido-líquido e cromatografia de camada fina: amostra 1 em relação ao cumafos e as amostras 8, 10 e 12 em relação ao metiocarbe sulfóxido.

**Tabela 15 – Resultados obtidos na pesquisa de cumafos, lindano, metiocarbe sulfóxido e amitraz por cromatografia de camada fina em mel adquirido na região de Lisboa**

Amostras	Pesticidas			
	Cumafos	Lindano	Metiocarbe sulfóxido	Amitraz
1	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
8	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
10	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
12	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Superior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g
16	Inferior 1 µg/g	Inferior 1 µg/g	Inconclusivo	Inferior 1 µg/g

A amostra de mel número 16 foi inconclusiva, na detecção/identificação de carbamatos em relação ao metiocarbe sulfóxido, uma vez que pelo método de visualização por lâmpada UV 254/366 nm foi visualizada a mancha, apresentando o mesmo factor de retenção que o padrão de metiocarbe sulfóxido; contudo após a pulverização com o reagente específico para carbamatos não foi obtido a coloração característica (manchas brancas em fundo azul claro).

Verificou-se que a visualização do metiocarbe sulfóxido em lâmpada UV apresentou uma maior sensibilidade em termos de limites de detecção que a pulverização com o reagente específico para carbamatos ou seja o limite de detecção é inferior no UV. Como não foi possível obter uma dupla confirmação (visualização em lâmpada UV e por pulverização com o reagente específico) pode-se afirmar que a presença de metiocarbe sulfóxido na amostra de mel número 16 é inconclusiva.

Noutras amostras verificou-se alguns aspectos que gostaríamos de referir.

A amostra 8, para além de apresentar Metiocarbe sulfóxido superior ao limite de detecção de 1 µg/g, mostrou na placa manchas num nível superior ao padrão Metiocarbe sulfóxido. Não foi um facto isolado pois o mesmo aconteceu nas amostras 9, 10, 11, 12, 13, e 16.

Poderão ser outros produtos de degradação do Metiocarbe ou outros produtos que foram revelados pelo reagente dos carbamatos.

### **4.3.3. Resultados das análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa**

#### 4.3.3.1. Pesquisa de *Salmonella*

Nas 23 amostras analisadas, seguindo a metodologia da Norma Portuguesa NP – 1933 (1982), o resultado para a pesquisa de *Salmonella* foi Ausente em 25 g de mel.

#### 4.3.3.2. Pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores

Nas 23 amostras analisadas, seguindo a metodologia da Norma Portuguesa NP – 2262 (1986), o resultado para a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores foi Ausente em 1 g de mel.

#### 4.3.3.3. Contagem de bolores e leveduras

Nas 23 amostras analisadas, seguindo a metodologia da Norma Portuguesa NP – 3277-1 (1987) não se verificou crescimento de colónias de bolores e leveduras em nenhuma das placas. O resultado para a contagem de bolores e leveduras foi assim inferior a 10 ufc /g de mel, para todas as amostras.

## **Capítulo V: Conclusões**

### **5.1. Desenvolvimento do método de extracção de pesticidas no mel**

Constata-se que os procedimentos de extracção teriam de ser aperfeiçoados, explorando o uso de outros solventes ou combinação de solventes ou outros procedimentos de extracção, para que a Cromatografia de Camada Fina fosse usada como metodologia de rastreio de pesticidas no mel, uma vez que o limite de detecção obtido foi bastante superior ao LMR de cada pesticida.

### **5.2. Caracterização da oferta de mel e conformidade de rotulagem**

A oferta de mel é diversificada, sendo a maioria dos produtos de origem nacional (69% das embalagens).

A apresentação varia entre as 30 g e 1 kg. São mais comuns as embalagens de 300 g (17%) e 500 g (30%). De um modo geral, as embalagens com capacidade inferior a 300 g aumentam o custo de kg de mel. O melhor preço encontra-se nas embalagens de 470 g mas tem grande influência os preços praticados pelas grandes superfícies (preço médio da embalagem é de 3,30 € e o preço do kg de mel é de 4,9 €).

As composições florais mais frequentes foram o “rosmaninho”, a “urze” e o “eucalipto”.

Em relação às menções obrigatórias de rotulagem, um rótulo não se apresentava em português. A origem do produto não foi mencionada em 10% das embalagens. A quantidade líquida faltava em 3% das embalagens. A morada do fabricante ou do embalador ou de um vendedor estabelecido na União Europeia esteve ausente em 11% das embalagens e a indicação de fax, telefone ou telemóvel (forma de contacto) não substitui a indicação da morada (localização no espaço geográfico). A identificação do lote não está presente em 10% das embalagens, o que não permite a rastreabilidade do produto conforme é exigido pela legislação em vigor (artigo 18º do Regulamento nº 178/2002), constituindo uma falha grave.

Todas as embalagens possuíam denominação de venda, data de durabilidade mínima, nome da firma ou denominação social de produtor/embalador/vendedor estabelecido na UE. Do conjunto 27%, das embalagens apresentaram-se de alguma forma como não conformes.

Do exposto concluímos que maior vigilância é necessária por parte das autoridades fiscalizadoras. Sobre operadores das empresas alimentares recai a principal responsabilidade jurídica, pelo que deviam estar informados de toda a legislação sobre o produto que vão colocar no mercado, o que não acontece dado as não-conformidades encontradas. Os que contactámos mostraram-se surpresos e questionaram sobre onde encontrar mais informação.

Não encontramos no mercado nenhuma embalagem de mel DOP nem de mel de MPB, provavelmente relacionado com os circuitos de comercialização (venda local, regional, venda directa ao consumidor e venda de parte da produção como não certificada) (PAN 2008-2010).

### **5.3. Detecção de pesticidas no mel por cromatografia de camada fina usando o método de extracção desenvolvido**

Resultados de cumafos, amitraz, metiocarbe sulfóxido e lindano, usando TLC e desenvolvimento unidimensional ascendente não foram encontrados na literatura.

Para o procedimento de extracção desenvolvido poder ser usado em Cromatografia de Camada Fina como metodologia de rastreio, deveria ter sido possível detectar Amitraz ao nível de 0,2 µg/g (LMR 200 µg/kg), Cumafos 0,1 µg/g (LMR 100 µg/kg), Lindano e Metiocarbe 0,00001 µg/kg (LMR 0,01 µg/kg) e então confirmar com uma técnica quantitativa. O limite de detecção encontrado teria de ser muito mais baixo aproximando-se dos valores dos Limites Máximos de Resíduos (LMR), motivo pelo qual o processo de extracção necessita de aperfeiçoamento.

Seria interessante usar uma técnica quantitativa para a determinação do Cumafos e Metiocarbe sulfóxido nas amostras de mel 1, 8,10,12 e 16.

### **5.4. Análises microbiológicas realizadas em amostras de mel adquiridas no mercado da região de Lisboa**

Nenhuma forma vegetativa de espécies bacterianas causadora de doença foi encontrada no mel (Snowdon & Cliver, 1996).

Esporos bacterianos do género *Bacillus*, são regularmente encontrados no mel, com teores variam entre 1 e 67 esporos/g. A espécie predominante parece ser *B. cereus* (em 48% das amostras), mas também se encontra *B. coagulans*, *B. megatorium* e *B. alvei* (Snowdon & Cliver, 1996).

Tysset *et al.* (1970), citado por Snowdon & Cliver (1996), detectou em mel os fungos *Ascosphaera*, *Aspegillus*, *Cephalosporium* e *Penicillium*, com teores de contaminação de 0 a 2500 ufc /g e com uma média de 250 ufc /g de mel (Snowdon & Cliver, 1996).

Martins *et al.* (2003) identificaram no mel as leveduras *Candida humicola* e *Saccharomyces sp.* O teor de contaminação situou-se entre  $10^3$  e  $10^4$  ufc /g.

Não foi detectado qualquer microrganismo em nenhuma das 23 amostras de mel seguindo a metodologia das Normas Portuguesas, NP 1933 (1982), NP 2262 (1986), NP 2077 (1985).

Podemos concluir que as 23 amostras de mel analisadas apresentam de acordo com as Normas Portuguesas, NP 1933 (1982), NP 2262 (1986), NP 2077 (1985) uma elevada qualidade microbiológica.

## Bibliografia

Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC International*, Vol. 86, Nº 2, 412-430.

Azeredo, L. da C., Azeredo, M., Sousa, S., Dutra, V. (2003). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins, *Food Chemistry*, 80, 249-254.

Bogdanov, S., Martin, P., Lüllmann, C. (1997). Harmonized methods of the European Honey Commission. Online em: [http://www.apiculturacluj.com/ApiculturaCluj/italiano/Documents/IHC\\_methods\\_e.pdf](http://www.apiculturacluj.com/ApiculturaCluj/italiano/Documents/IHC_methods_e.pdf), acedido em 2010-01-14.

Bogdanov, S., Ruoff, K., Oddo, L. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: a review, *Apidologie* 35, S4-S17.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products, *Apidologie*, 37, 1-18.

Bogdanov, S., Jurndic, T., Sieber, R., Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: a review, *American Journal of the College of Nutrition*, 27, 677-689.

Bogdanov, S. (2009). The book of honey. Online em: [www.bee-hexagon.net/en/honey.htm](http://www.bee-hexagon.net/en/honey.htm), acedido em 2009-10-01.

Bernal, J.L., Nozal, M.J., Jiménez, J.J. (1997). Influence of solvent and storage conditions on the stability of acaricide standard stock solutions, *Journal of Chromatography A*, 765, 109-114.

Casida, J.E., Quistad, G.B. (2004). Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects, *Journal of Pesticide Science*, 29, 81-86.

CATIM (2009). Breve história das abelhas. Centro de Apoio Técnico à Indústria do Mel. Online em: <http://www.catim.com>, acedido em 2009-08-21.

Codex Stan 12 – 1981, Codex Standard for Honey, Rev 2 (Rev. 1987 and 2001), Vol. 11, p. 1-8.

Comissão Europeia (2008). Managing food contaminants: how the EU ensures that our food is safe. Online em: [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/fs\\_contaminants\\_final\\_web\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/fs_contaminants_final_web_en.pdf), acedido em 2009-12-06.

Corta, E., Bakkali, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. (1999). Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS, *Talanta*, 48, 189-199.

Corta, E., Bakkali, A., Barranco, A., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F., Bogdanov, S. (2000). Study of the degradation products of bromopropylato, chlordimeform, coumaphos, cymiazole, flumetrin and tau-fluvalinate in aqueous media, *Talanta*, 52, 169-180.

Crane, E. (1999). *The world history of beekeeping and honeyhunting*, (2 nd Ed.), Editor Duckworth.

Decisão 97/747/CE da Comissão, de 27 de Outubro de 1997, JO L 303 de 6.11.1997, p. 12-15.

Decisão 2000/801/CE da Comissão, de 20 de Dezembro, JO L 324 de 21.12.2000, p. 42-43.

Decisão 2003/881/CE da Comissão, de 11 de Dezembro de 2003, JO L 328 de 17.12.2003, p. 26-31.

Decreto-Lei nº 1/2007 de 2 de Janeiro, Diário da República nº 1 – Iª série, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Decreto-Lei nº 148/99, Diário da República nº 103 – Iª série A, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Decreto-Lei nº 199/2008 de 8 de Outubro, Diário da República nº 195 – Iª Série, Ministério da Economia e da Inovação. Lisboa.

Decreto-Lei nº 203/2005 de 25 de Novembro, Diário da República nº 227 – Iª Série-A, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Decreto-Lei nº 214/2003 de 18 de Setembro, Diário da República nº 216 – Iª Série-A, Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.

Decreto-Lei nº 238/1986 de 19 de Agosto, Diário da República nº 189 – Iª Série, Ministério da Indústria e Comércio. Lisboa.

Decreto-Lei nº 560/1999 de 18 de Dezembro, Diário da República nº 293 – Iª Série-A, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Despacho nº 3838/2006 de 3 de Fevereiro, Direcção-Geral de Veterinária, Diário da República nº 35 – II Série de 17 de Fevereiro. Lisboa.

Despacho nº 14 536/2006 de 21 de Junho de 2006, Ministérios das Finanças e da Administração Pública e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, Diário da República nº 131 – II Série de 10 de Julho. Lisboa.

DGV (2009). Folheto – Doenças das abelhas. Diagnóstico, tratamento e profilaxia. Direcção-Geral de Veterinária, Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Online em: [http://www.dgv.minagricultura.pt/saude\\_animal/docs/Folheto%20%20Doenças%20das%20Abelhas.pdf](http://www.dgv.minagricultura.pt/saude_animal/docs/Folheto%20%20Doenças%20das%20Abelhas.pdf), acedido em 2009-12-28.

DGV (2010). Mapa das Zonas Controladas Março 2010. Online em: [http://www.dgv.minagricultura.pt/saude\\_animal/docs/Lista%20de%20Concelhos%20por%20Zona%20Controlada\\_Março%202010%20.pdf](http://www.dgv.minagricultura.pt/saude_animal/docs/Lista%20de%20Concelhos%20por%20Zona%20Controlada_Março%202010%20.pdf), acedido em 2010-03-24.

Directiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de Julho de 1991, JO L 230 de 19/8/1991, p. 1-32.

Directiva 92/65/CEE do Conselho, de 13 de Julho de 1992, JO L 268 de 14.9.1992, p. 54-72.

Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 de Abril de 1996, JO L 125 de 23.5.1996, p. 10-32.

Directiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Março de 2000, JO L 109 de 6.5.2000, p. 29-42.

Directiva 2001/110/CE do Conselho, de 20 de Dezembro de 2001, JO L 10 de 12.1.2002, p. 47-52 .

EC (2002). Honey and microbiological hazards, Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to Public Health, adopted on 19-20 June 2002. Online em: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out53\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out53_en.pdf), acedido em 2009/10/08.

EFSA (2009). Cadmium in food, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain, *EFSA Journal*, 980, 1-139.

EMEA (1999). EMEA/MRL/572/99-FINAL, February, Amitraz (Bees), Summary Report (2).

EMEA (2001). EMEA/MRL/769/00-FINAL, January, Coumafos, Summary Report (2).

Eurostat Pocketbooks (2008). Food: from farm to fork statistics. Published Set-2008. Online em: [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY\\_OFFPUB/KS-30-08-339/EN/KS-30-08-339-EN.PDF](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-30-08-339/EN/KS-30-08-339-EN.PDF), acedido em 2009-12-13.

Eurostat Yearbook (2009). Agriculture Forestry and Fisheries. Online em: [http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/publications/eurostat\\_yearbook](http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/publications/eurostat_yearbook), acedido em 2009-12-13.

FAO (2008). Rapid assessment of pollinator' status. Food and Agriculture Organisation of the United Nation, Rome. Online em: <http://www.fao.org/docrep/012/i1046e/i1046e00.htm>, acedido em 2009-11-29.

FAOSTAT (2009). Production; Livestock Primary. Online em: <http://FAOSTAT.fao.org/site/569/default.aspx#ancor>, acedido em 2009-11-29.

FNAP (2008). Zonas Controladas. Sanidade Apícola uma responsabilidade de todos. Folheto FNAP 2008, disponível em: [http://www.fnap.pt/gestor/downloads/doc\\_8.pdf](http://www.fnap.pt/gestor/downloads/doc_8.pdf), acedido em 2010-01-24.

Fórum Nacional de Apicultura, 2007. Resultados do Rastreio Apícola 2006. Online em: [http://www.dgv.min-agricultura.pt/saude\\_animal/docs/Programa%20Sanitário%20Apícola%202008%20-%20ANEXO%201\\_Resultados%20de%20rastreo%20nacional.pdf](http://www.dgv.min-agricultura.pt/saude_animal/docs/Programa%20Sanitário%20Apícola%202008%20-%20ANEXO%201_Resultados%20de%20rastreo%20nacional.pdf), acedido em 2010-01-24.

Fried, B., Sherma, J. (1999). *Thin-Layer Chromatography*. (4th ed.), New York: Taylor & Francis Group.

Gibbs, P. (2002). Characteristics of spore-forming bacteria, cap.15. In *Foodborne pathogens, Hazards, risk analysis and control*, Ed, Clive de W. Blackburn and Peter J. McClure, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England.

Gleiter, R.A., Horn, H., Isengard, H.-D. (2006). Influence of type and state of crystallisation on water activity of honey, *Food Chemistry*, 96, 441-445.

Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Bayarri, S., Lázaro, R., Yagüe, C., Ariño, A. (2005). Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 695-701.

IARC-*International Agency for Research on Cancer* (2009). Agents reviewed by the IARC monographs volumes 1-100A. List of all agents evaluated to date (listed by alphabetical order). Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. Online em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>, acedido em 2009-10-30.

INE Instituto Nacional de Estatística (2009). Online em: [http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000203&contexto=bd&selTab=tab2](http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000203&contexto=bd&selTab=tab2), acedido em 2009-12-29.

INSA (2006). Tabela de Composição de Alimentos, Ed. Centro de segurança Alimentar e Nutrição Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

Jimenez, J.C., Nozal, M.J., Bernal, J.L., Santos, M., Mayorga, A.L. (2002). Factors affecting the extraction, hydrolysis and derivatization steps for the quantitation of total residues of amitraz in honey by gas chromatography with electron capture detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, 300-304.

Jones, K.C. (1987). Honey as an indicator of heavy metal contamination, *Water, Air and Soil Pollution*, 33, 179-189.

Kesié, A., Mazalovié, M., Crnkié, A., Catovié, B., Hadzidedic, S., Dragosevic, G. (2009). The influence of L-Ascorbic acid content on total antioxidant activity of bee-honey, *European Journal of Scientific Research*, Vol.32, N°1, 95-101.

Koca, I., Koca, A.F. (2007). Poisoning by mad honey: A brief review, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1315-1318.

Kujawski, M.W., Namiésnik, J. (2008). Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.27, N°9, 785-793.

Lei nº 24/1996 de 31 de Julho, Diário da Republica nº 176/96 – Iª Série-A, Assembleia da República.

López, A.C., Alippi, A.M. (2007). Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey, *International Journal of Food Microbiology*, 117, 175-184.

Martel, A-C., Zeggane, S. (2002). Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, *Journal of Chromatography A*, 954, 173-180

Martins, H.M., Martins, M.L., Bernardo, F.M.A. (2003). *Bacillaceae* spores, Fungi and aflatoxins determination in honey, *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98, 85-88.

Midura, T.F., Snowden, S., Wood, R.M., Arnon, S.S. (1979). Isolation of *Clostridium botulinum* from honey, *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 9, N°2, 282-283.

Midura, T.F. (1996). Update: Infant Botulism, *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 9, N°2, 119-125.

Molan, P.C. (2001). Potential of honey in the treatment of wounds and burns, *American Journal of Clinical Dermatology*, 2(1), 13-19.

Molan, P.C. (2006). Using honey in wound care, *International Journal of Aromatherapy*, 3(2), 21-24.

Monetto, A.M., Francavilla, A., Rondini, A., Manca, L., Siravegna, M., Fernandez, R. (1999). A study of botulinum spores in honey, *Anaerobe*, 5, 185-186.

Moreira, R.F.A., De Maria, C.A.B. (2001). Glúcidos no mel, *Química Nova*, Vol. 24, Nº 4, 516-525.

Nevas, M., Lindström, M., Hautamäki, K., Puoskari, S., Korleala, H. (2005). Prevalence and diversity of *Clostridium botulinum* types A, B, E, and F in honey produced in the Nordic countries, *International Journal of Food Microbiology*, 105, 145-151.

NP 1933 (1982). Norma Portuguesa, *Microbiologia Alimentar, Regras gerais para pesquisa de Salmonella*. Instituto Português da qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 2262 (1986). Norma Portuguesa, *Microbiologia Alimentar, Regras gerais para a pesquisa de esporos de clostrídeos sulfito-redutores*. Instituto Português da qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

NP 3227 (1987). Norma Portuguesa, *Microbiologia Alimentar, Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25°C*. Instituto Português da qualidade, Ministério da Industria e Energia. Lisboa.

Noticias Apícolas (2009). Historia de la apicultura. La Apicultura hasta el año 1500; La Apicultura desde el 1501 al 1850. Argentina. Online em: <http://www.noticiasapicolas.com>, acedido em 2009-08-21.

Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Ola, I.O. (2007). Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes, *African Health Sciences*, Vol. 7, Nº 3, 159-165.

OIE – World Organisation for Animal Health (2010). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009. Online em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.0\\_BEE\\_NOTE.pdf](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.02.0_BEE_NOTE.pdf), acedido em 2010-01-08.

Özcan, M., Arslan, D., Ceylan, D.A. (2006). Effect of inverted saccharose on some properties of honey, *Food chemistry*, 99, 24-29.

PAN 2008-2010 – Programa Apícola Nacional Triénio de 2008-2010, Online em: [http://www.fnap.pt/gestor/doc\\_up/documento\\_cnt\\_papicula\\_12.pdf](http://www.fnap.pt/gestor/doc_up/documento_cnt_papicula_12.pdf), acedido 2010-01-26.

Pan, C., Zhang, H., Chen, S., Xu, Y., Jiang, S. (2006). Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use of QuEChERS clean-up, *Acta Chromatographica*, N° 17, 320-327.

Paula, J. (2008), Mel de Brasil, as exportações brasileiras do mel no período 2000/2006 e o papel do SEBRAE, Brasília SEBRAE 2008.

PNCR 2008 Resultados (2008). Online em: [http://www.dgv.min/agricultura.pt/higiene\\_publica/docs/Relatório\\_resultados2008.pdf](http://www.dgv.min/agricultura.pt/higiene_publica/docs/Relatório_resultados2008.pdf), acessado em 2010-04-04.

Pohl, P. (2009). Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 28, N° 1, 117-128.

POPRC (2007). Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, Persistent Organic Pollutants Review Committee (POPRC), Draft Risk Management Evaluation for Lindane, May.

Portaria n.º 699/2008 de 29 de Julho, Diário da República I Série n.º 145, Ministérios da Economia e da Inovação e da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Preste, O.D., Friggi, C.A., Adaime, M.B., Zanella, R. (2009). QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduos de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, *Química Nova*, Vol. 32, N° 6, 1620-1634.

Produção de mel. Introdução e Histórico. Online em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico.htm>, acessado em 2009-08-21.

Produtos fitofarmacêuticos com venda autorizada. Online em: [http://www.dgadr.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd\\_lista/prod\\_vend\\_aut.htm](http://www.dgadr.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introd_lista/prod_vend_aut.htm), acessado em 15 de Dezembro de 2009.

Produtos de Uso Veterinário autorizados, 27 de Abril de 2009. Online em: [http://www.dgv.min/agricultura.pt/medicamentos\\_veterinarios/docs/LISTAGEM%20PUV%20ordem%20alfabética%20de%20NOME%20-%2027-04-2009.pdf](http://www.dgv.min/agricultura.pt/medicamentos_veterinarios/docs/LISTAGEM%20PUV%20ordem%20alfabética%20de%20NOME%20-%2027-04-2009.pdf), acessado em 2009-12-15.

PSA – 2009. Programa Sanitário Apícola 2009 – Direcção Geral de Veterinária.  
Online em: [http://www.dgv.min-agricultura.pt/saude\\_animal/docs/Programa%20Sanitário%20Apícola%202009.PDF](http://www.dgv.min-agricultura.pt/saude_animal/docs/Programa%20Sanitário%20Apícola%202009.PDF), acedido em 2010-01-24.

Recomendação da Comissão 2006/88/CE de 6 de Fevereiro.

Regulamento (UE) N° 37/2010 da Comissão, de 22 de Dezembro de 2009, JO L 15 de 20.1.2010, p. 1-72.

Regulamento (CE) N° 149/2008 da Comissão, de 29 de Janeiro de 2008, JO L 58 de 1.3.2008, p. 1-398.

Regulamento (CE) N° 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002, JO L 31 de 1.2.2002, p. 1-24.

Regulamento (CE) N° 178/2006 da Comissão, de 1 de Fevereiro de 2006, JO L 29 de 2.2.2006, p. 3-25.

Regulamento (CE) N° 396/2005 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Fevereiro de 2005, JO L 70 de 16.3.2005, p. 1-16.

Regulamento (CE) N° 470/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 6 de Maio de 2009, JO L 152 de 16.6.2009, p. 11-22.

Regulamento (CE) N° 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, JO L 93 de 31.3.2006, p. 12-25.

Regulamento (CEE) N° 737/90 do Conselho, de 22 de Março de 1990, JO L 82 de 29/03/1990 p. 1-6.

Regulamento (CE) N° 797/2004 do Conselho, de 26 de Abril de 2004, JO L 125 de 28.4.2004, p. 1-3.

Regulamento (CE) N° 834/2007 do Conselho, de 28 de Junho de 2007, JO L 189 de 20.7.2007, p. 1-23.

Regulamento (CE) N° 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, JO L 139 de 30.4.2004, p. 1-54.

Regulamento (CE) N° 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de Abril de 2004, JO L 139 de 30.4.2004, p. 55-205.

Regulamento (CE) N° 889/2008 da Comissão, de 5 de Setembro de 2008, JO L 250 de 18.9.2008, p. 1-84.

Rezic, I., Horvart, A.J.M., Babié, 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.

Ridgway, K., Lalljie, S.P.D., Smith, R.M. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in food, *Journal of Chromatography A*, 1153, 36-53.

Rissato, S.R., Galhiane, M.S., Almeida, M.V., Gerenuti, M., Apon, B.M. (2007). Multiresidue determination of pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry and application in environmental contamination, *Food Chemistry*, 101, 1719-1726.

Rodrigues, A.L., Correia, M.I., Belas, A., Santos, A.I., São Braz, B., Carrapiço, B., Moreira, A., Silva A.J. (2005). Screening Analytical Methods for pesticides detection in animal tissues, *Toxicology Letters*, 158, Suppl.1 (2005), S142-S143.

Santos, S.P. (2002). A química dos insecticidas (Parte I), *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 85, 43-47.

SCOOP (2004). "Assessment of the dietary exposure to arsenic, cadmium, lead and mercury of the population of the EU Member States", Report of task 3.2.11, Março. Online em: [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop\\_3-2-11\\_heavy\\_metals\\_report\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/scoop_3-2-11_heavy_metals_report_en.pdf), acedido em 2009-10-30.

Scott, R. (2003). Principles and Practice of Chromatography. Online em: <http://www.chromatography-online.org/Principles/contents.html>, acessado em 2009-04-19.

Sherma, J. (2003). Recent advances in Thin-Layer Chromatography of pesticides: a review, *Journal AOAC International*, Vol.86, Nº3, 602-611.

Snowdon, J.A., Cliver, D.O. (1996). Microorganisms in honey, *International Journal of Food Microbiology*, 31, 1-26.

Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoney, *Food Chemistry*, 113, 568-574.

Soeiro, T. (2006). Em busca do doce sabor, *Revista Portugalia*, 27-28, 119-158.

Tosi, E.A., Ré, E., Lucero, H., Bulacio, L. (2004). Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition, *LWT-Food Science and Technology*, 37, 669-678.

Touchstone, J.C. (1992). *Practice of Thin Layer Chromatography*. (3th Ed.). A. Wiley-Interscience Publication.

Uniprot Taxonomy (2009). Disponível em: <http://www.uniprot.org/taxonomy/7460>. Acessado em 2010-01-10.

Valbuena, A.O. (1992). Contribución a la denominación de origen de la miel de la Alcarria. Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

Vargas, T. (2006). Avaliação da qualidade do mel produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná. Dissertação para obtenção do título de mestre em Ciências e Tecnologia dos Alimentos. Brasil: Universidade Estadual de Ponta Grossa.

WHO (2003). Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. Health Risks of Persistent Organic Pollutants from Long range Transboundary Air Pollution. World Health Organization Europe, 252 p. Online em: <http://www.euro.who.int/Document/e78963.pdf>, acessado em 2009-05-06.

WHO (2004). The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2004. Online em: [http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides\\_hazard\\_rev\\_3.pdf](http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_rev_3.pdf), acedido em 2009-05-06.

*Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (2nd Ed.). (1999). Frederick J. Francis (Editor), pp. 148-153.

## Anexos

### 1. Folha de recolha de dados relativa à informação ao consumidor e rastreabilidade

- (1) Idioma utilizado – português (S/N) \_\_\_\_ Se N, qual o idioma? \_\_\_\_\_
- (2) Tipo de embalagem (X): Vidro \_\_\_\_ Plástico \_\_\_\_ Outro. Qual? \_\_\_\_\_
- (3) Forma do rótulo (X): Etiqueta \_\_\_\_ Cinta \_\_\_\_ Gargantilha \_\_\_\_ Documento \_\_\_\_
- (4) Tamanho dos caracteres (mm) \_\_\_\_\_
- (5) Denominação de venda (X):
- 5.1. Origem: Mel de néctar \_\_\_\_ Mel de flores \_\_\_\_ Mel de melada \_\_\_\_ Identificação floral \_\_\_\_
- 5.2. Modo de produção e/ou apresentação (X): Mel de favos \_\_\_\_ Mel com pedaços de favos \_\_\_\_ Mel escorrido \_\_\_\_ Mel centrifugado \_\_\_\_ Mel prensado \_\_\_\_ Mel filtrado \_\_\_\_  
Outro \_\_\_\_
- (6) Quantidade líquida g \_\_\_\_\_
- (7) Cor \_\_\_\_\_
- (8) Alegação de efeitos ou características especiais \_\_\_\_\_
- (9) Linha de apoio ao consumidor \_\_\_\_\_
- (10) Data do fabrico \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- (11) Data limite de consumo \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_
- (12) Nome ou firma ou denominação social – NCV \_\_\_\_\_
- (13) Nº do Apicultor – UPP \_\_\_\_\_
- (14) Morada do fabricante, embalador ou vendedor na UE \_\_\_\_\_
- (15) Condições especiais de conservação (X): Luz \_\_\_\_ Temperatura \_\_\_\_ Humidade \_\_\_\_  
Outra, qual \_\_\_\_\_
- (16) Local de origem ou proveniência (X): País \_\_\_\_\_ Mistura de méis CE \_\_\_\_  
Mistura de méis não CE \_\_\_\_ Mistura de méis CE e não CE \_\_\_\_
- (17) Identificação do lote: \_\_\_\_\_
- (18) Local de compra (X): Hipermercado \_\_\_\_ Supermercado \_\_\_\_ mercearia de bairro \_\_\_\_  
Outro \_\_\_\_\_

Comentários:

## 2. Folha de recolha de dados relativa à caracterização da oferta

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

(1) Caracterização do estabelecimento: Hipermercado\_\_\_\_ Super\_\_\_\_ Merceria\_\_\_\_  
Frutaria\_\_\_\_ Charcutaria\_\_\_\_ Mercado\_\_\_\_ Pastelaria\_\_\_\_ Outros\_\_\_\_

(2) Local (Rua, bairro) \_\_\_\_\_

(3) Secção em que o mel está exposto\_\_\_\_\_

(4) Resguardo da luz directa (S/N)? \_\_\_\_\_

(5) Nº de marcas existentes \_\_\_\_\_

(6) Origem (nº de marcas) (região/país)

De apicultores\_\_\_\_\_

De melarias \_\_\_\_\_

Importador \_\_\_\_\_

(7) Rotulagem: nº de marca conforme ou não conforme

	Conformes	Não conformes
Idioma utilizado – português _____	_____	_____
Quantidade líquida _____	_____	_____
Durabilidade mínima _____	_____	_____
Origem _____	_____	_____
Nº Lote _____	_____	_____
Nome/morada _____	_____	_____
Condições conservação _____	_____	_____

(8) Observações

### **3. Procedimento de Extração para Lindano (OC), Cumafos (OF), Metiocarbe (C)**

- 1- Pesar para um copo 50 g de mel
- 2- Fortificar com 50 µl da solução padrão (1 µg/µl) de cada um dos pesticidas, ficando as amostras com um nível de fortificação de 1.000 µg/kg. Homogeneizar e deixar à temperatura ambiente para evaporar a acetona
- 3- Adicionar 50 ml de uma mistura de metanol e água na proporção 70:30 e homogeneizar com agitador magnético durante 30 minutos
- 4- Adicionar 60 ml de diclorometano e homogeneizar com agitador magnético durante 30 minutos
- 5- Adicionar 60 ml de n-hexano; transferir para uma ampola de decantação
- 6- Recolher a fase superior
- 7- Adicionar 30 ml de n-hexano à fase inferior
- 8- Recolher a fase superior
- 9- Repetir o passo 7 e 8
- 10- Adicionar sulfato de sódio anidro à fase superior
- 11- Colocar o extracto num balão redondo e evaporar em banho-maria a 30°C

#### **4. Procedimento de Extração para Amitraz (Formamidina)**

- 1- Pesar para um copo 20 g de mel
- 2- Fortificar com 20 µl da solução padrão (1 µg/µl) do Amitraz, ficando a amostra com um nível de fortificação de 1.000 µg/kg. Homogeneizar com vareta e deixar evaporar a acetona
- 3- Adicionar 1 ml de água para facilitar a homogeneização
- 4- Adicionar uma mistura de n-hexano e acetona, na proporção 80:20, e 0,28% amónia. O pH será de 11,5 medido com papel indicador
- 5- Adicionar a mistura, preparada em 4, à amostra de mel e colocar a homogeneizar com agitador magnético durante 20 minutos a 100 rpm
- 6- Repetir o passo 5 duas vezes
- 7- Transferir para uma ampola de decantação. Após separação de fases recolher a fase superior
- 8- Adicionar sulfato de sódio anidro
- 9- Colocar o extracto num balão redondo e evaporar no rotavapor.

## 5. Reagentes e revelação utilizados

### 5.1. Reagente revelador para organofosforados – Cumafos

- 1- Ácido clorídrico (1N). Medir 8,3 ml de ácido clorídrico e completar a 100 ml com água destilada
- 2- Pesar 0,5 g de dicloreto de paládio
- 3- Num balão de 100 ml adicionar 50 ml de água destilada e o dicloreto de paládio. Adicionar 10 ml de ácido clorídrico (preparado em 1) e completar a 100 ml com água destilada

**Revelação:** Estufa 110°C durante 15 minutos. Manchas amarelas fundo bege.

### 5.2. Reagente revelador para organoclorados – Lindano

- 1- Num balão de 200 ml misturar 0,1 g de nitrato de prata, 0,5ml de água destilada e 30 ml de 2 fenoxietanol
- 2- Diluir até 200ml com acetona
- 3- Adicionar 2 a 3 gotas de água oxigenada a 30%

**Revelação:** Exposição à luz UV durante 20 a 30 minutos. Manchas castanhas, fundo castanho claro.

### 5.3. Reagente revelador Carbamatos – Metiocarbe

- 1- Num balão de 50 ml misturar 0,5 g de cloreto de zinco, 0,25 g de difenilamina, arrastar os produtos com ajuda de acetona
- 2- Completar a 50 ml com acetona
- 3- Tapar e agitar para dissolução completa

**Revelação:** Estufa 110°C durante 15 minutos. Manchas brancas fundo azul claro.

### 5.4. Reagente revelador – Amitraz

- 1- Pesar 0,2 g de niidrina para um balão de 100 ml e perfazer com 1-butanol
- 2- Num balão de 100 ml colocar 10 ml de ácido acético glacial e perfazer a 100 ml com água
- 3- À solução preparada em 1 adicionar 5 ml da solução prepara em 2

**Revelação:** Estufa 110°C durante 15 minutos. Manchas violeta fundo branco.