



RESÍDUOS DE ANTIBIÓTICOS NO MEL: REGULAMENTAÇÃO, PRESENÇA EM AMOSTRAS REAIS E MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E DETEÇÃO

Na apicultura, a utilização de antibióticos com o objetivo de prevenir ou tratar as infeções bacterianas pode resultar na contaminação do mel com estes compostos. Apesar de a regulamentação não estabelecer limites máximos para estes resíduos nos produtos apícolas, a sua deteção e quantificação no mel é essencial para garantir o consumo seguro deste alimento.

Helena Rodrigues^{1,2}, Marta Leite^{2,3}, Maria Beatriz Oliveira^{1,3}, Andreia Freitas^{2,3}

¹ Universidade do Porto, Faculdade de Farmácia



² Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária



³ REQUIMTE/LAQV



Introdução

O mel é um dos mais antigos alimentos consumidos e foi utilizado como adoçante em todo o mundo durante muitos anos, até à introdução da cana-de-açúcar. Pode ser definido como “substância doce natural produzida pelas abelhas *Apis mellifera* a partir do néctar das plantas ou das secreções das partes vivas das plantas ou das excreções dos insetos sugadores de plantas sobre as partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam por combinação com substâncias específicas próprias, depositam, desidratam, armazenam e deixam amadurecer nos favos de mel” (European Commission, 2014).

O mel é um alimento complexo composto essencialmente por água e hidratos de carbono. Na sua composição podem ainda estar incluídos outros componentes como, por exemplo, aminoácidos, minerais, enzimas, compostos fenólicos e flavonoides. A quantidade de cada nutriente pode variar de acordo com alguns fatores, incluindo as condições geográficas e ambientais, a fonte floral, o método de extração, entre outros. Para além da sua composição nutricional, outro aspeto de agrado do consumidor está relacionado com os efeitos benéficos associados ao mel que se relacionam com a sua capacidade antioxidante e antimicrobiana.



Figura 1 – Esquema representativo dos principais aspetos positivos e negativos associados ao mel.

Consumo e produção em Portugal

Para 2022, os dados estatísticos do Instituto Nacional de Estatística apontam que Portugal produziu cerca de 11,465 toneladas de mel e que, em média,

cada português consumiu 1,3 kg de um total das 14 mil toneladas consumidas entre 2022 e 2023.

Doenças bacterianas das abelhas

O declínio no número de polinizadores, incluindo as abelhas, está relacionado com vários fatores que incluem a poluição ambiental, alterações climáticas, mudanças na utilização de solos e perdas de habitats, exploração agrícola intensiva e utilização de pesticidas e, ainda, espécies invasoras e doenças infecciosas causadas por bactérias, vírus, fungos e, parasitas. No contexto deste artigo, as doenças bacterianas geralmente mencionadas são a Loque Americana e Europeia e a Nosemose.

Mel e fármacos veterinários

Nas práticas apícolas, é comum a aplicação de antibióticos por *spray* ou por alimentação com o propósito de controlar ou tratar as doenças bacterianas já mencionadas. De entre os vários antibióticos das diferentes classes destacam-se os aminoglicosídeos, cloranfenicol, fumagilina, lincosamidas, macrólidos, nitrofuranos, nitroimidazóis, fluoroquinolonas e quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina.

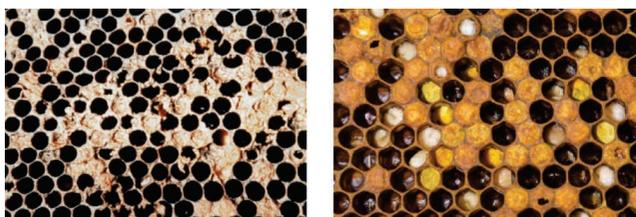


Figura 2 – Aspeto de colónias infetadas com a Loque Americana (à esquerda) e Loque Europeia (à direita).

A utilização de antibióticos na apicultura pode resultar na acumulação de resíduos de antibióticos no mel. Numa perspetiva do produto, observa-se uma diminuição da qualidade deste alimento, o que pode resultar em risco para a sua comercialização e, do ponto de vista dos consumidores, a capacidade destas substâncias em persistirem no alimento durante certos períodos, podendo ainda resultar em efeitos tóxicos diretos no consumidor.

Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)

Entre 2002 e 2022, das notificações RASFF recebidas

em mel (Figura 3), um total de 79,6% eram relativas a resíduos de fármacos veterinários, mais concretamente sulfonamidas, nitrofuranos, aminoglicosídeos, macrólidos, lincosamidas, nitroimidazóis, quinolonas, tetraciclina e resíduos de cloranfenicol. Estes resíduos foram detetados em amostras de mel que tinham as mais variadas origens, entre elas, Argentina, Austrália, Chile, China, Eslováquia, Espanha, Hungria, Índia, Israel, Itália, Lituânia, Polónia, Portugal, República Checa, Roménia, Turquia e Ucrânia (Eissa & Taha, 2023).



Figura 3 – Representação gráfica do número e tipo de notificações RASFF para o mel (2002–2022).

Enquadramento regulamentar

A legislação a aplicar deve ser capaz de impedir que os resíduos de medicamentos veterinários (ou resíduos de antibióticos) entrem na cadeia alimentar e de controlar os seus níveis para evitar efeitos negativos na saúde dos consumidores. A aplicação da legislação deve ter em conta os produtos autorizados, os limites máximos de resíduos (LMR) e as diretrizes para métodos de análise já existentes.

No âmbito da utilização de fármacos veterinários em animais produtores de alimentos, a regulamentação divide as substâncias em dois grupos: Grupo A – Substâncias proibidas/banidas (cloranfenicol, nitrofuranos e nitroimidazóis) e Grupo B – Substâncias autorizadas (aminoglicosídeos, lincomicina, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina).

O Regulamento (UE) n.º 37/2010 da Comissão esta-

belece os Limites Máximos de Resíduos (LMR) para os antibióticos em alimentos de origem animal antes que estes fármacos possam ser utilizados em animais produtores de alimentos. O facto de não existirem LMR definidos para estas substâncias no mel ou em outros produtos apícolas significa que a sua utilização na apicultura não está regulamentada (European Commission, 2010).

Em relação às técnicas analíticas e aos limites definidos, uma vez que não há uma harmonização regulamentar, alguns países definiram níveis aceitáveis ou recomendados para os resíduos destes fármacos no mel, que incluíram Limites Máximos de Resíduos (LMR), Limite de Ação e Limites de Não conformidade.

Presença de antibióticos em amostras reais

A presença destas substâncias foi demonstrada em vários estudos utilizando técnicas de extração e de

deteção semelhantes às mencionadas nas secções seguintes. Os méis analisados tinham origem em diferentes países e foram adquiridos em lojas de conveniência/*online*, supermercados, mercados locais/*agrícolas* ou diretamente de produtores/cooperativas produtoras. Os resíduos de fármacos veterinários detetados pertenciam à classe das tetraciclina, sulfonamidas, macrólidos, lincosamidas, fluoroquinolonas, nitroimidazóis e metabolitos de nitrofuranos. Em termos das concentrações obtidas, estas eram variadas, sendo de notar que alguns resíduos se encontravam a concentrações inferiores ao Limite de Quantificação (LDQ) do método aplicado (Tabela 1).

Métodos para extração e deteção de antibióticos

O desenvolvimento de métodos de extração e deteção para resíduos de antibióticos em matrizes ali-

Tabela 1 – Estudos de ocorrência de resíduos de antibióticos em amostras reais de mel

Origem do Mel	Resíduo de Antibiótico	Concentração (µg/kg)
China	Metronidazol	5,87 – 66,95
	Ciprofloxacina	52,91 – 89,43
Geórgia	Estreptomicina	35,0 – 117,0
	Gentamicina C1	32,0
Canadá	Tilosina A	< LDQ – 0,0176
	Tilosina B	0,0021 – 0,0703
	Sulfametazina	< LDQ
	Sulfadimetoxina	< LDQ – 0,0074
Turquia	Quinolonas	1,4 – 41,3
China	Lincomicina	5,25
China	Nitrofuranos (metabolitos)	1,20 – 3,36
Itália, Hungria, Roménia, Espanha, Sérvia e outros países	Sulfatiazol	0,5
	Sulfametazina	1,3
	Tetraciclina	0,5
	Oxitetraciclina	1,1
China (Sudeste)	Metaciclina	159,9
	Oxitetraciclina	4,0
	Tetraciclina	2,6 – 215,3
	4-Tetraciclina	4,6 – 232,7
Brasil	Enrofloxacina	< LQ

mentares complexas, como é o caso do mel, torna-se cada vez mais importante, especialmente quando o método permite quantificar resíduos pertencentes a mais do que uma família de antibióticos. A dificuldade em desenvolver este tipo de métodos relaciona-se com o facto de os antibióticos em análise apresentarem diferentes características, por exemplo, no que diz respeito à sua estrutura química, polaridade, solubilidade e condições de estabilidade.

A escolha do método de extração mais adequado deverá ter em conta as características da matriz alimentar (mel), as propriedades físico-químicas dos analitos (resíduos de antibióticos) e os protocolos que possam já estar descritos na literatura. Estes métodos permitem que haja concentração e separação dos antibióticos, simplificando a sua futura deteção. No caso do mel, os métodos mais utilizados para extração de antibióticos incluem a extração sólido-líquido, extração em fase sólida, extração em fase sólida dispersa, extração líquido-líquido e método QuEChERS (Simone *et al.*, 2017).

Métodos de extração

Extração Sólido-Líquido

Alguns autores mencionam a aplicação de uma técnica que envolve apenas a diluição do mel recorrendo a soluções ácidas ou soluções tampão, seguida da injeção deste extrato obtido no sistema cromatográfico sem aplicação de um passo de limpeza ou purificação do extrato.

Extração Líquido-Líquido

Esta técnica é muitas vezes utilizada como passo inicial de preparação da amostra em vários protocolos e tem por base a transferência dos analitos da matriz aquosa (mel) para um solvente imiscível em água, como o acetato de etilo, diclorometano e clorofórmio.

Extração em Fase Sólida

A técnica de extração em fase sólida é uma das mais utilizadas para análise de compostos que se encontram em concentrações vestigiais nas amostras. Esta técnica consiste na ligação dos analitos (resíduos de antibióticos) aos grupos funcionais presentes



Figura 4 – Representação do procedimento de extração em fase sólida (colunas de extração e sistema de vácuo).

na superfície da matriz de sílica ou de polímeros e a sua seguinte libertação ou eluição utilizando um solvente capaz de quebrar estas ligações formadas. A seletividade desta técnica depende da força da interação entre os resíduos de antibióticos e os grupos presentes na superfície do adsorvente nas colunas. De entre as colunas mais utilizadas destacam-se as Oasis HLB, Strata X-C e Strata XI.

Extração em Fase Sólida dispersa

A extração em fase sólida dispersa é uma variação da técnica anterior na qual os analitos não ficam retidos numa superfície física adsorvente, mas permanecem na matriz. O adsorvente frequentemente mencionado neste procedimento, para o caso do mel, é o PSA.

Método QuEChERS

Mais recentemente, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) tem vindo a ser mais amplamente utilizado para a análise de pesticidas e outros contaminantes, incluindo os antibióticos. Este pode ser descrito como uma varia-

ção da extração líquido-líquido seguida de um passo de extração em fase sólida dispersa. Frequentemente, homogeneiza-se a amostra e depois adiciona-se à mesma uma solução de acetonitrilo e sais para ocorrer extração e partição, sendo os mais utilizados Na_2SO_4 , NaCl , Na_2EDTA e MgSO_4 . O segundo passo corresponde à purificação de uma parte do sobrenadante adicionando uma substância adsorvente ou combinação de substâncias, entre as quais, PSA, C18 e MgSO_4 .

Métodos de detecção

Em alimentos, a análise de resíduos é realizada recorrendo a técnicas que permitem uma elevada seletividade e precisão, assim como a detecção de resíduos de antibióticos presentes no mel em concentrações muito baixas. Geralmente, Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa do tipo Triplo Quadrupolo é a técnica escolhida perante matrizes alimentares complexas, como é o caso do mel.

O sistema cromatográfico permite a separação das diferentes moléculas para a sua seguinte detecção através de análise por espectrometria de massa. Para a maioria dos antibióticos, a separação cromatográfica ocorre em colunas de fase reversa, exceto para os aminoglicosídeos. Na questão da detecção, os estudos mais recentes relatam a utilização de detetores do tipo tempo de voo (*Time of Flight*, ToF), Orbitrap e Qtrap.



Figura 5 – Sistema de Cromatografia Líquida acoplado a sistema de Espectrometria de Massa com detetor Tempo de Voo (UHPLC – ToF-MS/MS).

Conclusões

O mel é um alimento com grande importância nutricional e funcional e, como tal, a sua segurança e qualidade devem ser constantemente garantidas. O uso excessivo de antibióticos na apicultura, a possível contaminação do mel, bem como a ocorrência de resíduos de antibióticos devem ser situações a evitar. A falta de definição regulamentar dos níveis máximos permitidos destes contaminantes nos produtos apícolas é uma problemática atual. O desenvolvimento e validação de métodos capazes de extrair e, posteriormente, detetar e quantificar resíduos de antibióticos em matrizes alimentares complexas, como o mel, é essencial para garantir o consumo seguro deste alimento. 🍯

Bibliografia

- Eissa, F.; Taha, E.-K. (2023). Contaminants in honey: an analysis of EU RASFF notifications from 2002 to 2022. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*.
- European Commission (2010). Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, **L 15**:1–72.
- European Commission (2014). Directive 2014/63/EU of the European Parliament and of the Council of 15 May 2014 amending Council Directive 2001/110/EC relating to honey. *Official Journal of the European Union*, **L 164**:1–5.
- Simone, M.; Giorgio, S.; Roberta, G. (2017). Residue Determination in Honey. In T. Vagner de Alencar Arnaut de (Ed.), *Honey Analysis* (p. Ch. 15). IntechOpen.