

OS ANTIBIÓTICOS NO MEL

Miguel Maia

Engº Zootécnico

5000-027 VILA REAL apismaia@sapo.pt

Nota do autor: A menção dos princípios activos (antibióticos) neste artigo é somente com o propósito de providenciar informação e não implica uma recomendação da sua utilização por parte do autor.

1. INTRODUÇÃO

Os antibióticos usualmente veiculados na apicultura para o controlo da loque americana (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) e europeia (*Melissococcus pluton*) são a oxitetraciclina (**OTC**) e as sulfamidas. Estes antibióticos criam resíduos no mel, o que poderá impossibilitar a sua comercialização devido à sua rejeição pelo comprador e pela não indicação dos seus limites no Regulamento (CE) 2377/90. Em questões de saúde pública, a problemática dos antibióticos deve-se à sua estabilidade por longos períodos de tempo no mel com possíveis reacções alérgicas em indivíduos susceptíveis.

2. CARACTERIZAÇÃO DOS ANTIBIÓTICOS

Por definição, os resíduos são os princípios activos e seus metabolitos que permanecem nos géneros alimentares provenientes de animais que tenham sido administrados medicamentos veterinários. Os resíduos de antibióticos vulgarmente identificados no mel são as tetraciclinas, as sulfamidas a estreptomicina, o cloranfenicol, os nitrofuranos e a tilosina (Bogdanov, 2006). Outros antibióticos são utilizados na apicultura, como é o caso da fumagilina para o tratamento da nosema (*Nosema apis*). De uma maneira geral, os antibióticos produzem produtos de degradação, sendo a sua detecção no mel, um indício da indevida utilização de antibióticos por parte do apicultor. Os antibióticos utilizados na apicultura estão indicados na tabela 1.

Tabela I. Antibióticos identificados e quantificados no mel

Princípio activo (<i>pa</i>)	Família	Formula empírica	LMR (<i>ppb</i>) (Regº 2377/90)	Forma de actuação
Cloranfenicol	Florfenicol	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	Não autorizado	Bacteriostático
Oxitetraciclina	Tetraciclina	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ .HCl	Não contemplado	Bacteriostático
Estreptomicina	Aminoglicósidos	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	Não contemplado	Bactericida
Sulfatiazol	Sulfonamidas	C ₉ H ₈ N ₃ O ₂ S ₂ Na	Não contemplado	Bacteriostático
Tilosina	Macrolídeo	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	Não contemplado	Bacteriostático

3. O COMPORTAMENTO DOS ANTIBIÓTICOS: DO APIÁRIO ATÉ À COMERCIALIZAÇÃO DO MEL

3.1. A época do ano

A colocação de tratamentos em colmeias durante o fluxo de néctar é altamente desaconselhada por facilitar a contaminação do mel após o fim do tratamento (Feldlaufer *et al.*, 2004; Martel *et al.*, 2006). O mel (néctar) do ninho contaminado poderá ser deslocado para as alças devido à necessidade de espaço para a criação. Porém, pode suceder-se a subsequente diluição do mel contaminado com o recolhido do fluxo de néctar e ocasionar a diminuição da concentração de antibióticos (Gilliam e Argauer, 1981). No entanto, esta diluição do mel pode não ser suficiente para “*mascarar*” os resíduos, visto que as técnicas de detecção de antibióticos permitem quantificar valores muito baixos, na ordem dos 2 a 20 *ppb* (μg de antibiótico por kg de mel).

3.2. Número e período de tempo dos tratamentos com antibióticos

O aumento do número e do período de tempo dos tratamentos acumula a quantidade de antibióticos na colmeia (Feldlaufer *et al.*, 2004).

3.3. Quantidade do princípio activo

Os antibióticos poderão não ser quantificados no mel ao fim de um determinado período de tempo - entenda-se quantidades abaixo dos limites de detecção - em função da sua meia-vida ($t = \frac{1}{2}$) e da quantidade inicial (Thompson *et al.*, 2006). A quantidade de um antibiótico introduzido por colmeia é variável, sendo 1 g para a OTC (Thompson *et al.*, 2006) e 200 mg para tilosina (Feldlaufer *et al.*, 2004). Como a tilosina possui um $t = \frac{1}{2}$ superior à OTC, a sua quantificação no mel é possível após um

período de tempo superior (Kochansky *et al.*, 1999). Feldlaufer *et al.*, (2004) aplicaram uma dose padrão (200 mg) e 1000 mg/colmeia de tilosina por pulverização e verificaram que esta última dose forneceu uma concentração 10 vezes superior em relação à dose padrão nas alças de mel.

3.4. Forma de aplicação

Os antibióticos veiculados por xarope apresentam maiores riscos de contaminação do mel em relação à pulverização devido à rápida disseminação do primeiro pela colónia (Martel *et al.*, 2006). O pulverizado não é tão apetecível para as abelhas e fica depositada na parte superior dos quadros do ninho (Thompson *et al.*, 2006). Gilliam e Argauer (1981) aplicaram o dobro da dose de OTC por pulverização em relação ao xarope, mas após 3 semanas do final do tratamento as concentrações de ambos os tratamentos foram semelhantes, o que significa que a OTC veiculada por pulverização não foi utilizada na sua totalidade. No entanto, esta comparação deve ser levada com atenção, visto que a OTC pulverizada pode apresentar elevadas concentrações (6 ppm) em zonas específicas do ninho (Thompson *et al.*, 2006) que, posteriormente, podem ser transportados para as alças (Martel *et al.*, 2006). A OTC quando fornecida por xarope sofre uma rápida degradação em comparação com os “candys” (Lodesani *et al.*, 1994). Este facto está de acordo com Sporns *et al.* (1986) que verificaram uma rápida degradação da OTC nos xaropes em relação ao mel. Possivelmente, este facto está relacionado com a elevada percentagem de água nos xaropes em comparação com outras aplicações.

3.5. Outros factores de contaminação do mel

- i)** A deriva das abelhas pode proporcionar o transporte de resíduos de colmeias com tratamentos para colmeias sãs (Martel *et al.*, 2006)
- ii)** a pilhagem de colmeias também pode ser um meio de difusão de resíduos no apiário, o que faz com que as colmeias em tratamento devam ser transportadas para locais isolados
- iii)** Kaufmann e Kaenzing, (2004) verificaram elevadas quantidades de sulfanilamida (sulfamidas) no mel em resultado dos produtos de degradação de um herbicida depositado nos nectários
- iv)** os quadros da colmeia Reversível podem representar um risco de contaminação devido ao tamanho dos quadros do ninho e alças serem de tamanhos idênticos, o que possibilita que os quadros do ninho (que apresentam uma maior contaminação) sejam trocados por alças do mel.

3.6. Trofalaxia da abelha

A trofalaxia consiste na troca de alimentos (néctar, mel, pólen, geleia) entre obreiras adultas como também entre obreiras e larvas e, por vezes, no roubo do alimento das larvas pelas abelhas adultas. Os antibióticos são distribuídos pela colmeia por este processo e excretados para os alvéolos do mel.

3.7. Dinâmica da colónia de abelhas

É verificado que colónias fortes consomem mais rapidamente o xarope fornecido em quantidades iguais e em igual período de tempo em relação às colmeias fracas. Neste sentido, as colmeias fracas tendem a integrar somente uma parte da concentração inicial do antibiótico, tendo Plavsa *et al.*, (2005) observado que a retenção de OTC no mel foi mais rápida em colónias fortes comparativamente a colónias fracas.

3.8. A abelha

O metabolismo da abelha é capaz de alterar a concentração inicial do antibiótico. Foi verificado (Martel *et al.*, 2006) que a tetraciclina degradou-se mais rapidamente no mel da colmeia do que no mel em laboratório a 35 °C, o que faz supor alguma responsabilidade por parte da abelha que poderá ser explicada pela sua actividade enzimática (Argauer e Moats, 1991).

3.9. A extração do mel e o seu armazenamento

O mel está sujeito a variadas temperaturas: **i)** a temperatura da sala de melaria pode variar entre 20 a 35°C para facilitar a manipulação do mel; **ii)** o armazenamento do mel pode ser com temperaturas variadas e por longos períodos; **iii)** o mel pode ser sujeito à pasteurização ($\pm 70^\circ\text{C}$). A temperatura a que o mel está sujeito tem influência no comportamento químico dos antibióticos.

Assim, ao longo dos variados processos que o mel sofre pela temperatura, pode suceder os seguintes factos:

i) diminuição da estabilidade das tetraciclinas pelo aumento da temperatura (Sporns *et al.*, 1986; Martel *et al.*, 2006), o que faz que os produtos de degradação sejam identificados no mel a 20 °C (Khong *et al.*, 2005);

ii) a fumagilina é estável no mel a 80 °C durante 35 dias (Assil e Sporns, 1991), ou seja, este antibiótico poderá não sofrer alterações com a pasteurização;

iii) a espectromicina, sendo um aminoglicosídeo, é estável ao calor e é quantificada no mel pelo menos durante 5 meses (Bruijnsvoort *et al.*, 2004); **iv)** as sulfonamidas também são resistentes ao calor (Kaufmann *et al.*, 2002).

3.10. As propriedades do mel e os resíduos

Conforme as propriedades químicas do mel, alguns antibióticos têm comportamentos variados. Assim, é possível constatar que:

i) o pH do mel promove a estabilidade da OTC (Sporns *et al.*, 1986; Khong *et al.*, 2005);

ii) a tilosina A é decomposta em desmicosina (tilosina B) em méis com baixos pH (Kochansky, 2004);

iii) ao longo do armazenamento as sulfonamidas desenvolvem complexos estáveis com a glucose do mel por longos períodos de tempo (Kaufmann *et al.*, 2002). Por isso não é de estranhar a elevada percentagem de amostras de mel contaminadas com sulfamidas.

3.11. A comercialização do mel

A comercialização é uma fase delicada pela possibilidade de misturar lotes de várias origens geográficas, o que faz aumentar o risco de contaminação do mel (Ortelli *et al.*, 2004). A detecção em méis de mistura de cloranfenicol com teores de 0,2 a 75 *ppb* (Verzegnassi *et al.*, 2003; Ortelli *et al.*, 2004), de estreptomicina, 10 a 170 *ppb* (Horie *et al.*, 2004), de metabolitos de nitrofuranos, 5 a 25 *ppb*, (Khong *et al.*, 2004), de sulfatiazol 600 *ppb* (Kaufmann *et al.*, 2002) é indicativo da complexidade do comércio internacional. Cerca de 20 a 50% do mel importado para a França, Bélgica e Suíça estava contaminado com sulfonamidas e espectromicina (Bogdanov, 2006). Heering *et al.*, (1998) identificaram diferentes famílias de antibióticos na mesma amostra o que indica a possível mistura de méis de várias origens. Alguns antibióticos podem servir de “bilhete de identidade” da origem geográfica do mel, como é o caso da estreptomicina que é usualmente usada na América Central e do Sul (Edder *et al.*, 1999) e o cloranfenicol no Sudeste asiático (Ortelli *et al.*, 2004).

Embora a legislação da UE vá no sentido de uma “*tolerância zero*” para os antibióticos, alguns EM (França, a Bélgica e o Reino Unido) possuem LMR de 10 a 50 *ppb* no conjunto das sulfamidas, devido aos diferentes limites de detecção das metodologias. Como resultado da falta de concordância de LMR, a comercialização do mel pode ser dificultada com consequentes prejuízos económicos para o apicultor. Como tal, seria de todo interessante a indicação de um limite mínimo de detecção para certos antibióticos ao nível da União Europeia.

4. METODOLOGIAS PARA DETECÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO MEL

Através da Directiva 96/23/CE e Decisão 2002/657CE as metodologias evoluíram pela obrigatoriedade de cada EM analisar um conjunto de resíduos no mel e pela exigência de obedecer a determinados requisitos metodológicos. As metodologias de rotina na identificação dos antibióticos no mel podem ser divididas em qualitativas e quantitativas. Os métodos ELISA e o Charm II são utilizados para a detecção de antibióticos no mel de uma forma qualitativa. Outros métodos qualitativos, como o TETRASENSOR[®] são importantes pela sua rapidez de resposta (Reybroeck *et al.*, 2007). No seu conjunto, estas metodologias têm limites de detecção entre 2 a 20 *ppb* consoante o princípio activo a quantificar. Devido ao desenvolvimento da espectrometria de massa (LC/MS) o limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) é de 0,3 *ppb* para o cloranfenicol.

5. CONCLUSÕES

A introdução de antibióticos no mel inicia-se com o intuito do apicultor prevenir /controlar as loques. As boas práticas indicam que no caso de loque americana, as colmeias devem ser destruídas em detrimento do controlo por antibióticos. Os antibióticos não devem ser colocados na colmeia com o intuito de prevenção e, caso a função seja profiláctica, a sua introdução deve ser acompanhada por um veterinário. É verificado que o exagerado número de tratamentos e quantidades, como também a sua colocação na colmeia durante o fluxo de néctar aumentam o risco de contaminação do mel. Em grande parte dos estudos foi verificado que os xaropes apresentam maiores riscos em relação à pulverização. Durante o armazenamento do mel, os antibióticos são estáveis e, mesmo que exista a sua degradação, os produtos de degradação são detectados. Devido à má utilização dos antibióticos, muitos lotes de mel podem ser rejeitados no comércio provocando enormes prejuízos na apicultura.

Do ponto de vista do consumidor, o mel é um produto de qualidade por ser natural/"biológico" e, como tal, a presença de resíduos neste alimento é um obstáculo ao desenvolvimento económico da apicultura. Assim, o conhecimento do comportamento dos resíduos no mel desde a "exploração *apícola* até à mesa" será útil para diminuir o risco de contaminação do mel, como também no aperfeiçoamento das metodologias de HACCP e dos Códigos de Boas Práticas.

BIBLIOGRAFIA

- Argauer, R. J. e Moats, W. A., 1991. Degradation of oxytetracycline in honey as measured by fluorescence and liquid chromatography assays. *Apidologie*, 22: 109-115.
- Assil, H. I. e Sporns, P., 1991. ELISA and HPLC methods for analysis of fumagillin and its decomposition products in honey. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 2206-2213.
- Bogdanov, S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie* 37: 1–18.
- Bruijnsvoort, M. V., Ottink, S. J. M., Jonker, K. M. e Boer, E., 2004. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1058: 137-142.
- Edder, P., Cominoli, A., e Corvi, C., 1999. Determination of streptomycin residues in food by solid-phase extraction and liquid chromatography with post-column derivatization and fluorometric detection. *J. Chromatogr. A*, 830: 345-351.
- DECISÃO 2002/657/CE de 12 de Agosto de 2002 relativamente ao desempenho de métodos analíticos e à interpretação de resultados, JOCE, L 221/8 de 17.8.2002
- DIRECTIVA 96/23/CE do Conselho de 29 de Abril de 1996 relativa a medidas de controlo a certas substâncias e aos seus resíduos nos animais vivos e respectivos produtos, JOCE, L 125/10 de 23.5.1996.
- Feldlaufer, M. F., Pettis, J. S., Kochansky, J. P. e Kramer, M., 2004. Residue levels in honey after colony treatment with antibiotic tylosin. *Apicult. Res.*, Feb.: 143-145.
- Gilliam, M. e Argauer, R. J., 1981. Oxytetracycline residues in surplus honey, brood nest honey, and larvae after medication of colonies of honey bees, *Apis mellifera*, with antibiotic extender sattles, sugar dusts, and syrup sprays. *Environ. Entomol.* 10: 479-482.
- Horie, M., Saito, H., Natori, T., Nagata, J. e Nakazawa, H., 2004. Determination of streptomycin and dihydro streptomycin in honey by liquid chromatography- electrospray mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.*, 27 (5): 863-874.
- Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R. e Marlbauer, E., 1998. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. *Analyst*, 123: 2759-2762.
- Kaufmann, A. e Kaenzig, A., 2004. Contamination of honey by the herbicide asulam and its antibacterial active metabolite sulphanilamide. *Food Adit. Contam.*, 21 (6): 564-571.
- Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B. e Widmer, M., 2002. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *J. AOAC Int*, 84 (4): 853-860.
- Khong, S. P., Hammel, Y. A., Guy, P. A., Stadler, R. H. e Mottier, P., 2005. Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 493-502.
- Khong, S. P., Gremaud, E., Richo, J., delatour, T., Guy, P. A., Stadler, R. H. e Mottier, P., 2004. Analysis of matrix-bound nitrofurans residues in Worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 5309-5315.
- Kochansky, J., 2004. Degradation of tylosin residues in honey. *J. Apicultural Res.* 43 (2): 65-68.
- Kochansky, J., Knox, D. e Shimanuki, H., 1999. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. *Apidologie* 30: 321-326.
- Lodesani, M., Carpana, E., Bassini, A., Dottori, M., Mascher, A. e La Vazza, A., 1994. Ricerca di residui di ossitetraclina in alveari trattati secondo due diversi metodi di somministrazione. *Apicoltura*, 9: 51-66.

- Martel, A-C, Zeggane, S., Drajnudel, P., Faucon, J-P e Aubert, M., 2006.** Tetracycline residues in honey after hive treatment. *Food Addit. Contamin.* 23 (3): 265-273.
- Ortelli, D.; Edder, P. e Corvi, C., 2004.** Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia*, 59, (½): 61-64.
- Plavsá, N. P., Djuricic, B. D., Baltic, M. B., Mladenovic, M. M., Nedic, N. N. e Rasic, S. R., 2005.** Use of antibiotics in controlling the diseases of bees and their presence in honey. In: “*Five Millennia of Beekeeping on your Doorstep*”. 39th Apimondia International Apicultural Congress, Dublin, Ireland. 21st-26th August; 144 p.
- Reybroeck, W., Ooghe, S., de Brabander, H., Daeseleire, E., 2007.** Validation of the tetrasensor honey test kit for the screening of tetracyclines in honey. *J. Agric. Food chem.* : 55, 8359–8366
- REGULAMENTO (CEE) N° 2377/90 do Conselho de 26 de Junho de 1990** que prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal, JOCE, L 224/1 de 18 de Agosto de 1990.
- Sporns, P., Kwan, S. e Roth, L. A., 1986.** HPLC analysis of Oxytetracycline residues in honey. *J. Food Protec.*, 49 (5): 383-388.
- Thompson, T. S., Waite, R. J., Wilkins, S., Brown, M. A., Bigwood, T., Shew, M., Ridgway, C. e Sharman, M., 2006.** Effects of shook swarm and supplementary feeding on oxytetracycline levels in honey extracted from treated colonies. *Apidologie* 37: 51-57.
- Verzegnassi, L., Royer, D., Mottier, P. e Stadler, R. H., 2003.** Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contamin.*, 20 (4): 335-342.